

Aus dem Institut für Immunologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato und deren  
serologischer Nachweis mittels spezifischer C6-Peptide  
bei Hunden sowie im murinen Infektionsmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Inke Krupka  
aus Hannover

Leipzig, 2010

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Gutachter:

Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.,  
Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen  
Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie,  
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr. Max Wittenbrink, Institut für Veterinärbakteriologie,  
Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 08.12.2009

Für meine Mutter, Ingrid Bense-Krupka † in liebevoller Erinnerung  
und meinen Vater, Bernd W. Krupka in Dankbarkeit.

*Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne, der uns beschützt und der uns hilft, zu leben.*

*(Herrmann Hesse)*



# Inhaltsverzeichnis

## Seite

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Der <i>Borrelia-burgdorferi</i>-sensu-lato-Komplex .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Mikrobiologische und morphologische Eigenschaften der Borrelien.....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Der Infektionszyklus von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4 Lyme-Borreliose.....</b>	<b>7</b>
2.4.1 Pathogenese und klinische Symptome.....	7
2.4.1.1 Mensch.....	7
2.4.1.2 Tiere .....	8
2.4.2 Therapie .....	10
2.4.3 Prophylaxe .....	11
<b>2.5 Mechanismen der Persistenz und Immunevasion .....</b>	<b>13</b>
2.5.1 Der vlsE-Locus und das Oberflächenprotein VlsE.....	14
<b>2.6 Die Immunantwort des Wirtes .....</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Diagnostik .....</b>	<b>17</b>
2.7.1 Anamnese und Vorbericht .....	17
2.7.2 Direkter Erregernachweis .....	17
2.7.3 Serologische Diagnostik .....	18
2.7.3.1 ELISA im Zweistufentest .....	19
2.7.3.2 Western-Blot im Zweistufentest .....	19
2.7.3.3 Das C6-Peptid-Testsystem.....	21
<b>3 Tiere, Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Tiere .....</b>	<b>24</b>
3.1.1 Tiere der serologischen Studie.....	24
3.1.2 Tiere im Infektionsversuch .....	25
<b>3.2 Material .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Reagenzien.....	26
3.2.2 Puffer/Lösungen .....	26
3.2.3 Puffer/Lösungen für den Lysat-Antigen-ELISA .....	26
3.2.4 Puffer/Lösungen für die SDS-PAGE und den Lysat-Antigen Western-Blot .....	27
3.2.5 Puffer/Lösungen für die DNA-Extraktion (Phenol-Chloroform-Fällung) .....	30
3.2.6 Puffer/Lösungen für die Gelelektrophorese (PCR-Produkte).....	30
3.2.7 Medien für die Borrelienanzucht .....	31
<b>3.3 Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.3.1 Methoden der serologischen Studie.....	33
3.3.1.1 Blutentnahme, Versand und Serumgewinnung .....	33

3.3.1.2 Konzept der serologischen Untersuchung und antibiotischen Therapie .....	33
3.3.1.3 Herstellung von Lysat-Antigen für die serologische Diagnostik .....	34
3.3.1.3.1 Anzucht der Borrelien und Präparation des Antigens .....	34
3.3.1.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Antigenfraktion .....	35
3.3.1.3.3 Kontrolle der Proteinqualität der Antigenfraktion.....	35
3.3.1.4 Serologische Methoden .....	35
3.3.1.4.1 Kinetischer ELISA (KELA) .....	36
3.3.1.4.1.1 Durchführung und Auswertung .....	36
3.3.1.4.2 SDS-PAGE und Western-Blot mit Lysat-Antigen .....	37
3.3.1.4.2.1 SDS-PAGE .....	37
3.3.1.4.2.2 Transfer des Proteins auf die Nitrozellulosemembran .....	37
3.3.1.4.2.3 Durchführung des Western-Blots .....	37
3.3.1.4.2.4 Auswertung des Western-Blots .....	38
3.3.1.4.3 Kommerzieller Western-Blot mit rekombinantem VlsE .....	39
3.3.1.4.3.1 Durchführung des Western-Blots .....	40
3.3.1.4.3.2 Auswertung des Western-Blots .....	40
3.3.1.4.4 C6-Schnelltest.....	41
3.3.1.4.5 Kommerzieller C6-ELISA-Test .....	42
3.3.1.4.5.1 Durchführung und Auswertung .....	43
3.3.1.4.6 C6-ELISA mit speziesspezifischen C6-Peptiden .....	43
3.3.1.4.6.1 Durchführung und Auswertung .....	44
3.3.2 Methoden des Infektionsversuchs .....	45
3.3.2.1 Anzucht der Borrelien .....	45
3.3.2.2 Infektionsmodell .....	46
3.3.2.2.1 Anästhesie der Mäuse .....	47
3.3.2.2.2 Intradermale Inokulation der Borrelien .....	47
3.3.2.2.3 Blutentnahme und Serumgewinnung.....	48
3.3.2.2.4 Gewebeentnahme.....	48
3.3.2.2.5 Kultivierung zur Anzucht und Isolierung von Borrelien.....	48
3.3.2.3 Serologische Methoden .....	50
3.3.2.3.1 KELA.....	50
3.3.2.3.2 Kommerzieller Western-Blot mit rekombinantem VlsE .....	50
3.3.2.3.3 Kommerzieller C6-ELISA Test.....	50
3.3.2.3.4 C6-ELISA mit speziesspezifischen C6-Peptiden .....	51
3.3.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	51
3.3.2.4.1 DNA-Extraktion mittels eines kommerziellen Extraktionskits .....	51
3.3.2.4.1.1 DNA-Extraktion aus den Borrelien .....	51
3.3.2.4.1.2 DNA-Extraktion aus den murinen Geweben.....	51
3.3.2.4.2 DNA-Extraktion unter Verwendung von Phenol-Chloroform .....	52
3.3.2.4.3 PCR zur Ermittlung des Plasmidgehaltes der Borrelien.....	52
3.3.2.4.3.1 Auswertung der PCR-Ergebnisse .....	53
3.3.2.4.4 Quantitative real-time PCR (qPCR) unter Verwendung der Taq Man Sonde.....	53
3.3.2.4.4.1 Herstellung der DNA-Verdünnungsreihen für die Standardkurve .....	53
3.3.2.4.4.2 Durchführung der qPCR.....	54
3.3.2.4.4.3 Auswertung der qPCR .....	55

## **4 Ergebnisse .....56**

### **4.1 Ergebnisse der serologischen Studie .....56**

4.1.1 Auswertung der Vorberichte .....	56
4.1.2 Serologische Untersuchungen der 1. Blutproben .....	58

4.1.2.1 Ergebnisse des Zweistufentests und C6-Schnelltests .....	58
4.1.2.2 Übereinstimmung von Vorbericht und serologischen Untersuchungsergebnissen ...	60
4.1.3 Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Therapie mit Antibiotika .....	61
4.1.3.1 Ausgewählte Hunde und Vorberichte .....	61
4.1.3.2 Therapie mit Antibiotika und Symptomentwicklung .....	61
4.1.3.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen vor und nach der Therapie .....	62
4.1.3.3.1 KELA.....	63
4.1.3.3.2 Untersuchungen mit dem kommerziellen Western-Blot .....	64
4.1.3.3.3 Ergebnisse der Untersuchungen mittels C6-Schnelltest .....	68
4.1.3.3.4 Untersuchungen mit dem kommerziellen C6-ELISA.....	69
4.1.3.3.5 Vergleich der C6-Peptid Testergebnisse .....	70
4.1.3.3.6 Ergebnisse der Untersuchung mit dem speziesspezifischen C6-Peptid-ELISA.....	72
<b>4.2 Ergebnisse des Infektionsversuchs.....</b>	<b>74</b>
4.2.1 Versuche zur Borrelienanzucht.....	74
4.2.2 Infektionsmodell .....	74
4.2.2.1 Isolierung von Borrelien aus murinen Geweben .....	74
4.2.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen .....	75
4.2.3.1 Untersuchungen mittels Lysat-Antigen (Zweistufentest) .....	75
4.2.3.1.1 KELA.....	75
4.2.3.1.2 Untersuchungen mit dem kommerziellen Western-Blot .....	77
4.2.3.1.3 Interpretation der Ergebnisse des Zweistufentests .....	80
4.2.3.2 Untersuchungen mittels des C6-Peptids .....	80
4.2.3.2.1 Kommerzieller C6-ELISA (Quant C <sub>6</sub> <sup>®</sup> -ELISA).....	80
4.2.3.2.2 ELISA mit speziesspezifischen C6-Peptiden .....	81
4.2.3.3 Vergleich der Sensitivitäten der verschiedenen C6-Peptide.....	88
4.2.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen.....	89
4.2.4.1 PCR zur Ermittlung des Vorhandenseins von lp25 und lp28-1 in Borrelien .....	89
4.2.4.2 Quantitative PCR (qPCR).....	90
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1 Serologische Studie .....	92
5.2 Infektionsversuch.....	98
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>106</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	
<b>I Anhang Tabellen .....</b>	<b>i</b>
<b>II Anhang Abbildungen.....</b>	<b>xxvii</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaar(e)
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
C <sub>t</sub>	threshold cycle (engl.)
C <sub>6</sub>	C6-Peptid
d	Tag (day)
DNA	desoxy-ribonucleic-acid (engl.)
EDTA	ethylendiamintetraacetate (engl.)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (engl.)
FAM	(6-Carboxy)-Fluoresreszein
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
HRP	horseradish peroxidase (engl.)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
IR	Invariable Region
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KELA	Kinetischer ELISA
l	Liter
lp	Lineares Plasmid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
Osp	outer surface protein (engl.)



PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline solution (engl.)
PCR	polymerase chain reaction (engl.)
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
p.i.	post inoculationem
qPCR	quantitative PCR
qs.	Quantum satis
BSA	Bovines Serumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (engl.)
SD	standard deviation (engl.)
SE	standard error (engl.)
sec	Sekunde(n)
TAMRA	Carboxy-Tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
V	Volt
VlsE	vmp-like sequence, expressed (engl.)
vmp	variable major protein (engl.)
W	Watt
WB	Western-Blot



# 1 Einleitung

Der Nachweis von Antikörpern gegen den Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi* (STEERE et al. 1983; STEERE 2001a), wird durch den ungewöhnlichen klinischen Verlauf dieser Erkrankung, aber auch durch das Vorkommen von mindestens drei pathogenen Borrelienspezies (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii*) in Europa stark erschwert. Die Nachweisverfahren in Europa müssen sensitiv genug sein, um Antikörper gegen diese drei Borrelienarten sicher zu erfassen, aber auch spezifisch die Infektion erkennen. Dabei ist das zeitaufwendige Zweistufentestsystem, bestehend aus ELISA und Western-Blot auch in der Tiermedizin die Methode der Wahl (GREENE et al. 2006), da auch Hunde an der Lyme-Borreliose erkranken können (APPEL 1990; APPEL et al. 1993). Seit mehreren Jahren wird in Tiermedizin und Humanmedizin versucht, den serologischen Nachweis von *B. burgdorferi* einfacher und dennoch spezifischer und aussagekräftiger zu gestalten. Das synthetische C6-Peptid erwies sich als eine sehr aussichtsreiche Antigenkomponente in einem einstufigen ELISA-Testsystem. Es basiert auf einer kurzen und konstanten Region des ansonsten hochvariablen Borrelien-Oberflächenproteins VlsE (LIANG et al. 1999b). In den USA wurde das C6-Testsystem zunächst für die Detektion von Antikörpern gegen die dort alleinig pathogene Art *B. burgdorferi* sensu stricto etabliert und erwies sich als hochspezifischer Infektionsmarker für Hund und Mensch (LIANG et al. 2000b). Das C6-Peptid soll sogar Hinweise über den Erfolg einer antibiotischen Therapie gegen *B. burgdorferi* geben können, da die C6-Antikörper in diesem Fall deutlich und nachhaltig absinken (FLEMING et al. 2004; LEVY et al. 2008; LIANG et al. 2000b). Allerdings existieren noch sehr wenige Daten über die Anwendbarkeit für europäische Verhältnisse. Für den Hund sind in Deutschland bereits ein Schnelltest und ein ELISA zugelassen. Einige neuere humanmedizinische Studien zweifeln die ausreichende Sensitivität von C6 gegenüber den europäischen Borrelienarten an (SILLANPAA et al. 2007; TJERNBERG et al. 2009).

Der Mangel an veterinärmedizinisch relevanten Daten für Europa sowie der Bedarf an einer einheitlicheren, aussagekräftigeren serologischen Borreliosediagnostik bewogen zu dieser Arbeit. Ob das verfügbare C6-Peptid als ausreichend sensitives Diagnostikum für die veterinärmedizinische Serologie in Deutschland geeignet ist oder ob die Speziesdiversität der vorkommenden Borrelienarten die Eignung eingrenzt, sollten sowohl die Durchführung einer serologischen Studie mit Hunden aus Deutschland, als auch ein experimenteller Infektionsversuch mit Mäusen analysieren. In dieser Arbeit erwiesen sich bestimmte C6-Peptid-Sequenzen auch in praxi als hochspezifische Infektionsmarker für die veterinärmedizinische Borreliose-Diagnostik in Deutschland. Allerdings können nicht alle der diskutierten oder bereits auf dem Markt propagierten Anwendungskonzepte des C6-Peptids für die veterinärmedizinische Diagnostik empfohlen werden. Die vorliegende Arbeit bestätigt vielmehr die Notwendigkeit weiterer, umfassender Untersuchungen bezüglich der Anwendungsmöglichkeiten und -grenzen des C6-Peptids in Europa.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Der *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplex

In den Jahren 1972 bis 1976 wurden in dem kleinen Ort Old Lyme (Conneticut, USA) gehäuft Arthritiden bei Kindern und Jugendlichen beobachtet, die durch den Humanmediziner Allen Steere dokumentiert und umgangssprachlich als „Lyme Arthritis“ oder auch „Lyme Disease“ benannt wurden (STEERE et al. 1977a). Im Jahr 1982 konnte schließlich der bakterielle Erreger dieser Erkrankung erstmals aus Zecken der Art *Ixodes dammini*, (inzwischen umbenannt in *Ixodes scapularis*) isoliert werden (BURGDORFER et al. 1982). Das Bakterium wurde nach seinem Entdecker Willy Burgdorfer als *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) benannt und gehört zu der taxonomischen Ordnung der *Spirochaetales*. Die *Spirochaetales* umfassen derzeit vier Familien, die *Brachyspiraceae*, die *Brevinemaceae*, die *Leptospiraceae* und die *Spirochaetaceae* (LUDWIG et al. 2008). Die letztgenannten *Spirochaetaceae* wiederum beinhalten die vier Gattungen *Spirochaeta*, *Borrelia*, *Treponema* und *Cristispira*. Dabei ist *Borrelia* taxonomisch sehr heterogen und die darunter vereinigten Spezies können anhand von genomischen Analysen der Oberflächenproteine und Aminosäuresequenzen in vier große Gruppen unterteilt werden (GREENE et al. 2006). Zwölf dieser Spezies (Tabelle 1) werden derzeit funktionell als *B.-burgdorferi-sensu-lato*-Komplex (*Bbsl*-Komplex) zusammengefasst (WANG et al. 1999b). Die darin gelisteten Borrelienarten werden ausschließlich durch Schildzecken übertragen. Jüngst wurden zwei potenziell neue Borrelienspezies in Nordamerika entdeckt: *B. californiensis* sp. nov. (POSTIC et al. 2007) und *B. carolinensis* sp. nov. (RUDENKO et al. 2008) sollen zukünftig dem *Bbsl*-Komplex zugeordnet werden. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, kommt in Europa und Asien eine deutlich größere Speziesvielfalt vor als in Nordamerika. Hier zeigt sich eine weitere gemeinsame Eigenschaft der Vertreter dieser Gruppe, denn sie werden ausschließlich in der nördlichen Hemisphäre aufgefunden. Drei Borrelienspezies, *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.), *B. garinii* und *B. afzelii* wurden als Verursacher der klinischen Lyme-Borreliose beim Menschen identifiziert. Dabei konnten alle drei Spezies sowohl aus den übertragenden Zecken, als auch aus menschlichen Geweben isoliert werden (BARANTON et al. 1992; BURGDORFER et al. 1982). Am häufigsten werden in Zentraleuropa *B. garinii* und *B. afzelii* in Zecken gefunden, gefolgt von *B. burgdorferi* s.s. (HUBALEK et al. 1998; HUBALEK et al. 1997; RAUTER et al. 2005). *B. spielmanii* (früher auch: *B. burgdorferi* A14S) und *B. lusitaniae* wurden inzwischen auch aus der menschlichen Haut isoliert (COLLARES-PEREIRA et al. 2004; FOLDVARI et al. 2005; FRANCA et al. 2005; RICHTER et al. 2004; WANG et al. 1999a) und *B. spielmanii* mit Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose in Verbindung gebracht.

Tabelle 1: Arten des *B.-burgdorferi*-sensu-lato-Komplexes

Art	Verbreitung
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Nordamerika (USA), Europa
<i>B. garinii</i>	Europa, Asien
<i>B. afzelii</i>	Europa, Asien
<i>B. valaisiana</i>	Europa, Asien
<i>B. spielmanii</i>	Europa
<i>B. lusitaniae</i>	Europa, Nordafrika
<i>B. andersonii</i>	Nordamerika
<i>B. bissettii</i>	Nordamerika, Europa
<i>B. tanukii</i>	Asien
<i>B. turdii</i>	Europa, Asien
<i>B. japonica</i>	Asien (Japan)
<i>B. sinica</i>	Asien
( <i>B. californiensis</i> sp. nov.)	Nordamerika (Westen)
( <i>B. carolinensis</i> sp. nov.)	Nordamerika (Südosten)

*B. spielmanii* konnte auch in Zecken aus Deutschland gefunden werden (FINGERLE et al. 2007). *B. lusitaniae* wurde auch aus Eidechsen isoliert (AMORE et al. 2007; RICHTER et al. 2006). Ob diese Spirochäten aber eine reelle pathogene Bedeutung haben, ist noch unklar. Vor kurzer Zeit wurde *B. lusitaniae* mit einer Vaskulitis bei einem 13-jährigen portugiesischen Mädchen in Verbindung gebracht, obwohl sie sich als serologisch negativ erwies (CARVALHO DE et al. 2008). *B. valaisiana* wird häufig in asiatischen und europäischen Schildzecken nachgewiesen (WANG et al. 1997). Bisher konnte nur die DNA dieser Borrelienart aus menschlichem *Liquor cerebrospinalis* und dem Blutplasma isoliert werden (DIZA et al. 2004; SAITO et al. 2007). Probleme bei der Speziesidentifikation asiatischer Zeckenisolate von *B. afzelii* und *B. valaisiana* zeigten sich in den letzten Jahren, denn hier wurden zunächst für *B. valaisiana* gehaltene Isolate (MASUZAWA et al. 2004; MASUZAWA et al. 1999) erst kürzlich als *B. afzelii* identifiziert (CHU et al. 2008). Außer *B. japonica* haben die weiteren in Tabelle 1 aufgeführten Borrelienarten keine erwiesene pathogene Bedeutung.

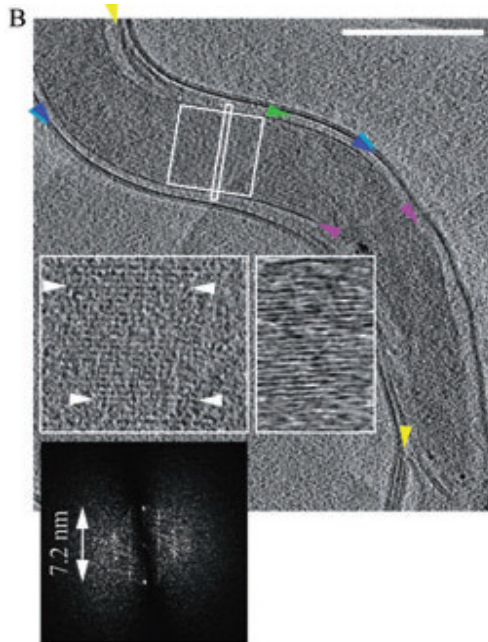
## 2.2 Mikrobiologische und morphologische Eigenschaften der Borrelien

Borrelien lassen sich bezüglich der Färbeeigenschaften weder den grampositiven, noch den gramnegativen Bakterien eindeutig zuordnen (SCHWAN et al. 1995a). Bei Anreicherung in Flüssignährmedien werden sie deshalb am besten mittels Phasenkontrast-Mikroskop oder Dunkelfeldmikroskop (siehe Abbildung 1) dargestellt. Auch eine direkte Silberfärbung ist möglich. Sie reagieren Katalase-negativ und sind mikroaerophil, chemoorganotroph und können langkettige Fettsäuren metabolisieren. Dabei liegt ihr Wachstumsoptimum unter Kulturbedingungen bei 33°C bis 37°C, während ihre Generationszeit ca. 12 Stunden beträgt. Ihre Kultivierung erfolgt in pH-neutralen Flüssignährmedien wie BSK-II, die viele verschiedene Nährstoffkomponenten enthalten müssen. Unter anderen sind Glukose und N-Acetylglukosamin essenziell für das Bakterienwachstum.



Abbildung 1: *B. burgdorferi* s.s. N40 in einer Darstellung mittels Dunkelfeldmikroskopie (Institut für Immunologie, Leipzig)

Wie auch andere pathogene, bedeutsame Spirochäten (zum Beispiel *Treponema pallidum* oder *Leptospira interrogans*) besitzen die Mitglieder der Gattung *Borrelia* einen spiralgewundenen Zellkörper. Dabei sind die Zellen etwa 20 bis 25 µm lang, bei einem Durchmesser von nur 0,2 µm. Der innenliegende protoplasmatische Zylinder enthält die Zellorganellen und wird von einer Zytoplasma-Membran (Lipid-Doppelschicht) umschlossen. In einer diese Membran umhüllenden dünnen Schicht ist Peptidoglykan (Murein) eingelagert. Direkt unter einer äußeren Hüllenmembran (Lipid-Doppelschicht) sind schließlich sieben bis elf kontraktile, periplasmatische Endoflagellen integriert. Diese entspringen an Basalkörpern, die an beiden Polen des zytoplasmatischen Zylinders lokalisiert sind. Die Endoflagellenbündel überlappen sich in der Mitte der Zelle. Sie ermöglichen eine Formveränderung und somit wellenartige, aktive Fortbewegung der Bakterienzelle. Eine muköse Schicht, die auf der äußeren Hüllenmembran liegt, schützt den Zellkörper vermutlich vor schädlichen Einflüssen (BARBOUR et al. 1986; CHARON et al. 2002; JOHNSON et al. 1984). In einer erst kürzlich erschienenen Studie (KUDRYASHEV et al. 2009) konnte dieser Zellaufbau der Borrelien mittels der Kryo-Elektronen-Tomografie (CET) genau gezeigt werden. In Abbildung 2 sind CET-Bilder der Borrelien-Ultrastruktur dargestellt. Erstmals wurden so die Zell-Ultrastrukturen von *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* untereinander verglichen. Die Anzahl der periplasmatischen Flagellen-Filamente unterschied sich bei den drei Arten. Während bei *B. burgdorferi* s.s. in der Polregion zwischen ein und fünf Filamente je Zelle gefunden wurden, waren es bei *B. afzelii* ein bis acht und bei *B. garinii* ein bis elf Filamente. Vergleichende 3D-Analysen dieser Studie zeigten eine ansonsten weitgehend übereinstimmende Zellmorphologie von *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*. Bei Zellen aller drei Spezies konnten Vesikel entdeckt werden, die mit der äußeren Hüllenmembran assoziiert waren und zum Teil perlschnurartig über kleine Kanäle untereinander verbunden sind. Vesikuläre Strukturen sind bei *B. burgdorferi* und *B. hermsii* schon länger bekannt, sie beinhalten spezifische Antigene und können eine Rolle bei der Immunmodulation spielen (DORWARD et al. 1991). Die Funktion der mukösen, amorphen Außenhülle ist nach wie vor fraglich. Es wird spekuliert, ob diese Hülle Proteinkomponenten des die Bakterienzelle umgebenden Mediums enthält, da Borrelien Blutserum-Komponenten wie humanen Faktor H oder Plasminogen mittels spezieller Rezeptoren anlagern können (FUCHS et al. 1994; HAUPT et al. 2007).

**A: Längsschnitt durch eine *B.-garinii*-Zelle mit filamentösen Strukturen**Große Abbildung:

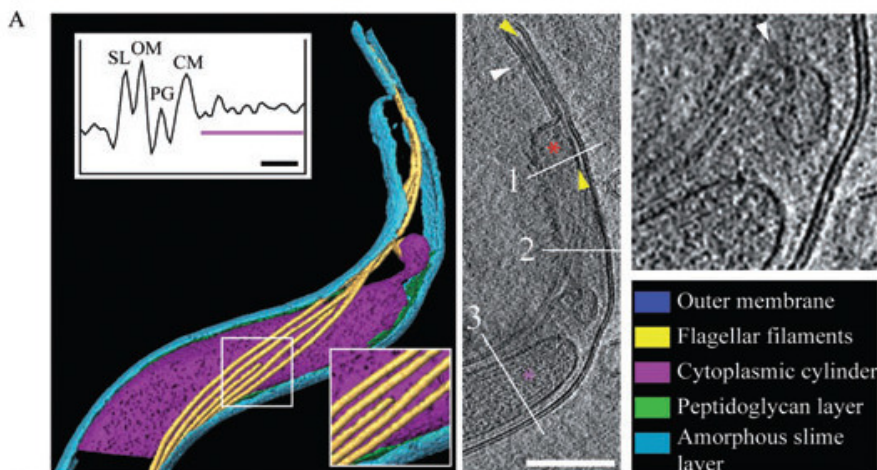
Blaue Pfeile: Amorphe, muköse Schicht mit darunterliegender, äußerer Hüllenmembran  
 Grüner Pfeil: Peptidoglykan-Schicht  
 Gelbe Pfeile: Periplasmatische Endoflagellen  
 Magentarote Pfeile: Zytoplasma-Membran  
 (Maßstab weißer Balken: 300 nm)

Linker und rechter Bildausschnitt:

Frontal- und Seitenansicht von Filamenten  
 Weiße Pfeile: Einzelfilamente

Untere Abbildung:

Spalt zwischen zwei Filamenten

**B.: Tomografische Analyse der Polregion von *B. burgdorferi* s.s.**Linke Abbildung:

Polregion mit Filamentverlauf der Flagellen

Mittlere Abbildung:

Weißer Pfeil: Äußere Membran mit einer Membranprotrusion; Roter Stern: Polarer Kegel

Rechte Abbildung:

Weißer Pfeil: Basalkörperanhang des Zytoplasmazyinders

Abbildung 2: Ultrastrukturmerkmale von Borrelienzellen (KUDRYASHEV et al. 2009)

### 2.3 Der Infektionszyklus von *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Im Gegensatz zu den *Leptospiraceae* sind die Mitglieder der Gattung *Borrelia* in der freien Umwelt nicht überlebensfähig. Außer denen das Rückfallfieber (Louse-borne relapsing fever) verursachenden Borrelien (z. B. *B. recurrentis*), welche durch Läuse (*Pediculus humanus* var. *capitis* und *corporis*) übertragen werden, benötigen alle anderen Spezies die Zecken als Vektor, um in Wirbeltierwirte transferiert zu werden. Dabei ist das Vorkommen der Borrelien eng an das Habitat der übertragenden jeweiligen Zeckenart geknüpft. Für den Bbsl-Komplex sind dies ausschließlich Schildzecken der Gattung *Ixodes*. So wird *B. burgdorferi* s.s. durch *I. pacificus* und *I. neotomae* im mittleren Westen der USA und der Pazifikküste übertragen (BROWN et al. 1992), dagegen von *I. scapularis* (früher *I. dammini*) (MCLAIN et al. 1995) im Osten und Südosten. In Europa und Teilen Asiens sind *I. ricinus* und *I. persulcatus* die Vektoren. Dabei kommt *I. ricinus* vorwiegend in West- und Zentraleuropa, *I. persulcatus* dagegen in Ost- und Südosteuropa vor (GRAY et al. 2002). Daraus ergibt sich, dass die Lyme-Borreliose nicht auf der Südhalbkugel der Erde anzutreffen ist, denn dort fehlen die Borrelien-übertragenden Schildzeckenarten. Die Zecken der Gattung *Ixodes* haben einen Lebenszyklus, der mehrere Wirtswechsel im Laufe ihrer mehrjährigen Entwicklung zur adulten Zecke vorsieht (Abbildung 3). Entsprechend sind viele Mausarten, aber auch Ratten sowie Igel und Maulwürfe wichtige Wirte für die noch wenig mobilen Larven und Nymphen. Es folgen größere Wirbeltierwirte wie Hirsche, aber auch Hund und Mensch. Auch können dies Reptilien oder Vögel sein.

Dabei spielen die Vögel eine wichtige Rolle für die Weiterverbreitung der Zecken und Borrelien über größere geografische Entfernungen (HUMAIR 2002; SMITH, JR. et al. 1996; TARAGEL'OVA et al. 2008). Die Infektion der Zecken mit Borrelien erfolgt erst im Larvenstadium während der ersten Blutmahlzeit, eine transovariable Übertragung hat je nach Studie keine Bedeutung oder erfolgt nur zu einem sehr geringen Prozentsatz (NEFEDOVA et al. 2004; PATRICAN 1997). Die noch kaum sichtbaren Nymphen können schon oft unbemerkte Überträger von Borrelien auf den Menschen sein und weisen je nach Studie eine Infektionsrate von 10 bis 25 % auf (GREENE et al. 2006). Die Infektionsrate der Zecken kann im adulten Stadium von Männchen und Weibchen durch eine weitere Blutmahlzeit als Möglichkeit der Borrelienaufnahme auf bis zu 75 % ansteigen (HUBALEK et al. 1998). Dabei sind in Deutschland sehr unterschiedliche Angaben zu der Infektionsrate der Zecken mit den verschiedenen Borrelienspezies zu finden. Allerdings zeigte sich, dass die Zecken vorwiegend mit *B. afzelii* oder *B. garinii*, gefolgt von *B. burgdorferi* s.s. infiziert sind (HUBALEK et al. 1997). In einer Untersuchung von Zecken aus Süddeutschland waren zum Beispiel 34,3 % der Zecken mit *B. afzelii*, 25,1 % mit *B. garinii*, 22,0 % mit *B. burgdorferi* s.s., 12,7 % mit *B. valaisiana* und 5,9 % mit *B. spielmanii* infiziert (FINGERLE et al. 2007).



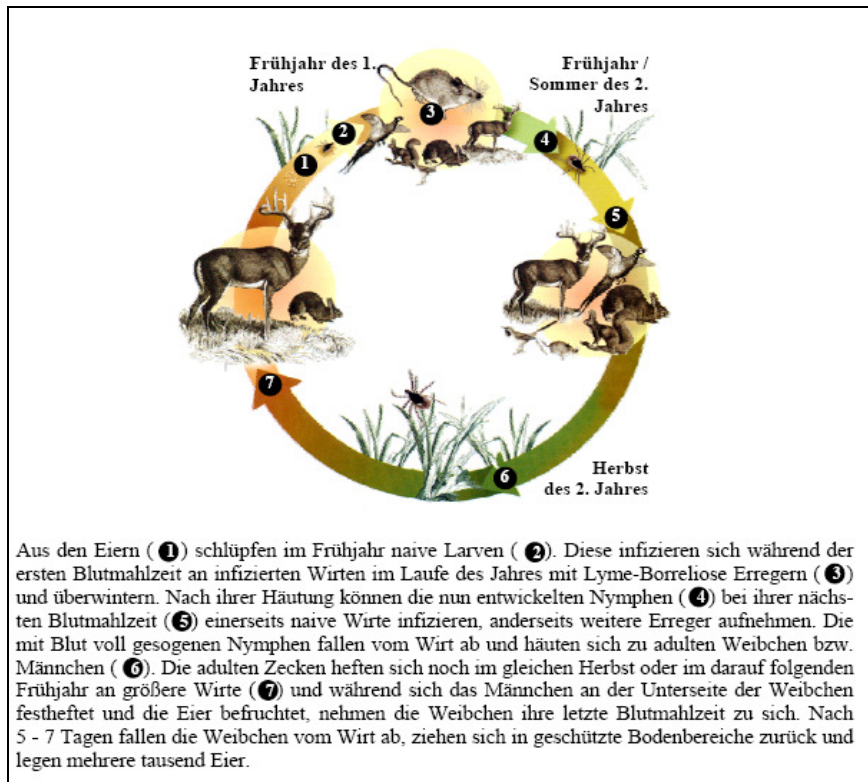


Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *Ixodes* spp.

## 2.4 Lyme-Borreliose

### 2.4.1 Pathogenese und klinische Symptome

#### 2.4.1.1 Mensch

Die Zecke überträgt die Borrelien mit ihrem Speichel nicht sofort nach dem Stich des Wirbeltierwirtes. Die Übertragung erfolgt wegen der benötigten Zeit der Wanderung der Borrelien vom Mitteldarm der Zecke in deren Speicheldrüsen erst nach etwa 24 bis 48 Stunden (OHNISHI et al. 2001; PIESMAN et al. 1997). Die Borrelien breiten sich von der Stichstelle der Zecke im Körpergewebe zentrifugal aus. Dabei liegen sie in der Regel extrazellulär vor (STRAUBINGER et al. 1997a). Sie sind neben der aktiven Fortbewegung in der Lage, an Plasminogen zu binden und somit Gewebe zu verdauen. Bei ihrer Wanderung weisen sie einen Tropismus zu Hohlorganen mit kollagenhaltigen Anteilen wie den Gelenken oder den Meningen auf. Ein Grund für diese Präferenz könnte die Defizienz der Borrelien an N-Acetylglucosamin (NAG) sein, welches sie zum Wachstum benötigen. NAG ist ein Bestandteil des Kollagens und könnte somit die Ursache für den Gewebetropismus sein (FRASER et al. 1997). Studien zeigten, dass die pathogenen Spezies eine Affinität zu bestimmten Körpergeweben und damit bestimmten klinischen Ausprägungen der Erkrankung haben. *B. afzelii* soll besonders an die Haut adaptiert sein, dagegen *B. garinii* an das Nervengewebe (Meningopolyneuritis). *B. burgdorferi* s.s. sei am häufigsten mit Erkrankungen der Gelenke assoziiert (Arthritis) (FINGERLE et al. 2007; VAN DAM et al. 1993), wobei die einzelnen Spezies auch in anderen Geweben vorkommen können (HOVIUS et al. 1999). Auf Grundlage der

Erkenntnisse über den klinischen Verlauf der Lyme-Arthritis (STEERE et al. 1977b) wurde die Lyme-Borreliose des Menschen in drei Stadien eingeteilt (STEERE 2001a).

Phase I – frühe Phase der Infektion: Das bei etwa 70 bis 90 % der Infizierten (NADELMAN et al. 1998) am häufigsten beobachtete und deshalb bekannteste klinische Leitsymptom ist das *Erythema migrans* (EM). Die Hautveränderung breitet sich kreisförmig um die Stichstelle der Zecke aus. Dies ist auf die unspezifische Immunantwort des Wirtes gegenüber den eingedrungenen Bakterien zurückzuführen. Die Haut kann dabei rötlich oder auch partiell livide sein, in der Regel blasst sie mit zunehmender flächiger Verbreitung zentral aus. Das EM tritt wenige Tage bis zu etwa vier Wochen nach dem Zeckenstich erstmals auf. Seltener werden in dieser Phase auch unspezifische, grippeähnliche Symptome wie Unwohlsein, Gliederschmerzen, Müdigkeit, Kopfschmerz und Fieber beobachtet, welche nach wenigen Tagen in der Regel wieder abklingen (GRAY et al. 2002).

Phase II – akute Phase: Sofern die Phase I übersehen bzw. keine antibiotische Therapie eingeleitet wurde, kann sich mit der Ausbreitung der Borrelien in die Körpergewebe eine systemische Infektion mit akuten Entzündungen entwickeln (NADELMAN et al. 1998). Diese kann beim Menschen die Haut (seltenes Borrelien-Lymphozytom (WEBER et al. 1985)), die Gelenke (frühe Lyme-Arthritis), das Nervensystem (Fazialisparese, aseptische Meningitiden (HALPERIN 2008; LJOSTAD et al. 2008)), Bannwarth-Syndrom (VIANELLO et al. 2008)) sowie selten das Herz (atrioventrikuläre Reizleitungsstörungen, Perikarditiden, Myokarditiden (STEERE et al. 1980)) betreffen. Die Lyme-Arthritis des frühen Stadiums tritt in Form einer akuten Mon- oder Oligoarthritis auf, die durch eine Schwellung und Füllung der Gelenke gekennzeichnet ist (PUIUS et al. 2008).

Phase III – chronische Phase: Diese Phase der Lyme-Borreliose kann bei wenigen Individuen im Verlauf von Monaten bis Jahren der Infektion auftreten und ist von wiederkehrenden Symptomen geprägt. Die *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) ist eine Hautmanifestation, die besonders an den Akren und der Haut größerer Gelenke auftritt. Die Haut ist pergamentpapierartig dünn, mit bräunlich- bis lividen Verfärbungen (LIPSKER 2007). Die akuten Arthritiden der Phase II gehen bei Patienten zu etwa 10 % in chronische Verläufe der Lyme-Arthritis über (STEERE et al. 2001). Diese ist definiert durch wiederkehrende Schwellungen und Ergüsse, die über ein Jahr lang andauern. Es können Gelenkspaltverengungen, Knochenerosionen und lokale Osteoporosen entstehen, die die Funktionstüchtigkeit der Gelenke stark einschränken (PUIUS et al. 2008).

### **2.4.1.2 Tiere**

Die Pathogenese der Lyme-Borreliose bei empfänglichen Tierarten kann nicht in deutlich abgrenzbare Phasen unterteilt werden, weist aber einen ähnlichen Verlauf auf. Dabei zeigen Affen die der Lyme-Borreliose des Menschen ähnlichsten klinischen Ausprägungen wie neurologische Symptome (PACHNER et al. 1995). Am intensivsten wurde die Entwicklung klinischer Krankheitsbilder bei experimentell infizierten Hunden untersucht, die bei bis zu 75 % der Tiere beobachtet wurden (APPEL et al. 1993; STRAUBINGER et al. 1998). Über die Häufigkeit klinischer

Symptome bei natürlich infizierten Hundepopulationen liegen keine zuverlässigen Daten vor. Es kann aber von einem wesentlich geringeren prozentualen Anteil gegenüber experimentell induzierten Infektionen ausgegangen werden, was sich auch später in der vorberichtlichen Analyse seropositiver Hunde in der vorliegenden Arbeit zeigt. Nach dem Stich einer infizierten Zecke kann sich eine Rötung entwickeln, wobei es sich lediglich um eine Hautreizung handelt, die auf eine akute Entzündungsreaktion zurückzuführen ist. Ein wie bei Menschen beobachtetes EM ist bei Hunden bisher nur selten nachgewiesen worden. Dieses könnte auch auf Grund der dichten Fellbehaarung nur schwer als Leitsymptom dienen. Erste, im Zusammenhang mit einem vorangegangenen Zeckenstich hinweisende Symptome sind Mattigkeit, Anorexie, regionale Lymphknotenschwellungen und in seltenen Fällen Fieber von 39,4 °C bis zu 40,5 °C, die ein bis wenige Tage andauern können (APPEL 1990; STRAUBINGER et al. 2000b). Lahmheiten und generelle Bewegungsunlust fallen im weiteren Verlauf auf. Experimentell (nach der Infektion mit *B. burgdorferi* s.s.) wurde die Entwicklung von hochgradigen Lahmheiten zwei bis sechs Wochen nach der Infektion beobachtet. Unter diesen Bedingungen entstehen ebenfalls Mon- bis Oligoarthritis, die hier zunächst an dem Gelenk auftreten, welches dem Bereich des Zeckenstichs am nächsten gelegen ist. Ähnlich wie beim Menschen sind die Lahmheiten intermittierend, die Gelenke angeschwollen und schmerzhaft gefüllt (STRAUBINGER et al. 1997a). Einige Fallbeschreibungen deuten darauf hin, dass bei Hunden Herzrhythmusstörungen und Myokard-Entzündungen auftraten, allerdings konnten die Borrelien selbst nicht nachgewiesen werden (LEVY et al. 1988). Als wesentlich schwerwiegender wurden akute Erkrankungen der Niere (akutes Nierenversagen) bei natürlich infizierten Hunden beschrieben, die sich in Glomerulonephritis, peripheren Ödemen, Lethargie, Erbrechen, Azotämie und Proteinurie äußerten. Die Erkrankung war dabei so schwer, dass die Tiere starben oder euthanasiert werden mussten. Histopathologische Untersuchungen der Nieren erlaubten den Nachweis von Immunkomplexen mit Borrelienantigenen, nicht aber den Nachweis von Borrelien (DAMBACH et al. 1997). Viele der Hunde aus der erwähnten Studie gehörten der Rasse Golden Retriever und Labrador an. In den letzten Jahren häuften sich Beobachtungen, dass vorwiegend bei Hunden der Rasse Berner Sennenhund infektionsspezifische Antikörper nachgewiesen werden können und ebenfalls zu der Ausprägung von Nierenerkrankungen neigen. In einer Studie wurden 160 asymptomatische Berner Sennenhunde serologisch untersucht. Bei 58 % konnten Serumantikörper nachgewiesen werden, wohingegen bei 62 Kontrollhunden anderer großer Hunderassen nur 15 % seropositiv reagierten (GERBER et al. 2007). Hier wurde auf Grund der signifikanten Daten eine Rasseprädisposition vermutet, die bisher nicht bewiesen wurde. Aus Beobachtungen der serologischen Diagnostik im Institut für Immunologie geht hervor, dass Berner Sennenhunde, bei denen serologisch Hinweise für eine Infektion ermittelt wurden, im Western-Blot oft sehr stark ausgeprägte Antikörperreaktionen gegenüber infektionsspezifischen Proteinen zeigen (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung). Klinisch manifeste neurologische Symptome wie bei der Lyme-Borreliose des Menschen wurden bisher bei Hunden im Zusammenhang mit einer Infektion nicht bewiesen.

Auch bei anderen Tierarten konnte, zumeist allerdings experimentell, eine Infektion mit Borrelien nachgewiesen werden. Bei zahlreichen Studien wurde die Empfänglichkeit von Mäusen und Ratten (MOODY et al. 1990; MOODY et al. 1994; MOODY et al. 1998), sowie auch die Ausprägung klinischer Symptome wie Arthritis nach experimentellen Infektionen von Mäusen mit *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* nachgewiesen (BARTHOLD 1999; CRAIG-MYLIUS et al. 2009). Experimentell infizierte Katzen zeigten Arthritiden (BURGESS 1992; GIBSON et al. 1995), wobei die klinische Borreliose bei natürlich infizierten Katzen noch nicht beschrieben wurde. Die Lyme-Borreliose wird bei Pferden sehr kontrovers diskutiert, da hier haltungs- und nutzungsbedingt generell viele Ursachen für Arthritiden oder Lahmheiten differenzialdiagnostisch auszuschließen sind (COHEN et al. 1988; COHEN et al. 1990; PARKER et al. 1992). Allerdings konnten bei experimentell infizierten Pferden sehr milde, teils unspezifische klinische Symptome wie leichtes Fieber und Lahmheit beobachtet werden (CHANG et al. 2000). Der Antikörpernachweis beim Pferd (MAGNARELLI et al. 2005; MULLER et al. 2002) ist aber möglich und wird inzwischen auch kommerziell von diagnostischen Laboratorien angeboten. Bei Rindern wurden noch mildere klinische Veränderungen gezeigt (TUOMI et al. 1997) und andere Daten legen nahe, dass in extensiver Landwirtschaft gehaltene Rinder sogar die Präsenz von Borrelien-übertragenden Zecken reduzieren können (RICHTER 2006). Dagegen entwickelten experimentell infizierte Kaninchen zwar deutlich ausgeprägte Hautveränderungen in Form von Erythemen und bilden Immunreaktionen aus, die spezifischen (C6)-Antikörper waren allerdings sehr spät im Verlauf der Infektion messbar (EMBERS et al. 2007c).

### **2.4.2 Therapie**

Die Lyme-Borreliose wird bei Menschen und Tieren mit Antibiotika behandelt, wobei der Erfolg maßgeblich von einer frühen Einleitung der Antibiose abhängt. Eine bereits chronische Erkrankung hat eine schlechtere Heilungsprognose, was im Falle experimentell infizierter Hunde bewiesen werden konnte (STRAUBINGER et al. 1997b). In der Humanmedizin wird kontrovers diskutiert, ob eine völlige Heilung und Erregereliminierung zu einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium möglich ist oder trotz der korrekt durchgeführten Antibiose klinische Symptome zurückkehren können (ABERER et al. 1996; SCHMIDLI et al. 1988; WANG et al. 1998). Die verwendeten Wirkstoffe für eine Antibiose gehören zu den Gruppen der Penicilline (wie Penicillin G, Amoxicillin, Ampicillin), Tetracycline (Doxycyclin) und der Cephalosporine (wie Ceftriaxon, Cefuroxim). Dabei werden für die Humanmedizin unterschiedlichste Therapieregime und Applikationsformen gewählt, die sowohl von der Phase der Lyme-Borreliose, den Symptomen, als auch vom Alter der Patienten abhängen. Es konnte gezeigt werden, dass bei schwerwiegenden klinischen Symptomen wie Enzephalopathien eine überwachte intravenöse Applikation von die Blut-Hirn-Schranke überwindenden Cephalosporinen sinnvoll ist (LOGIGIAN et al. 1999).

Bei der Therapie des Hundes wird häufig das per os applizierbare Doxycyclin (10 mg/kg, alle 12 Stunden) verwendet, dem auch eine chondroprotektive Wirkung bei nicht infektiösen Arthritiden zugeschrieben wird (YU, JR. et al. 1992). Bei Jungtieren im Wachstum und zu Magengeschwüren neigenden Hunden ist Doxycyclin kontraindiziert. Hier wird Amoxicillin (20 mg/kg, alle 8 bis 12 Stunden) per os empfohlen. Die Therapie sollte mit beiden Wirkstoffen über 28 bis 30 Tage erfolgen. Bei schwerwiegenden chronischen Arthritiden oder Kardiiden werden dagegen intravenöse Applikationen (14 bis 30 Tage lang) von Penicillin G (22.000 U/kg, alle 8 Stunden) oder auch Ceftriaxon (25 mg/kg, alle 24 Stunden, auch subkutan applizierbar) nahegelegt (GREENE et al. 2006; STRAUBINGER et al. 2000b). Oft wird bereits nach ein bis zwei Tagen eine deutliche Besserung des Gesundheitszustandes beobachtet, wobei aber auch eine spontane Verbesserung der Symptomatik ohne eine Antibiose gezeigt wurde (APPEL et al. 1993).

### 2.4.3 Prophylaxe

#### Impfung:

Der Wirkmechanismus der Impfung gegen eine Infektion mit Borrelien ist einzigartig. Der Impfstoff wird aus rekombinantem OspA (Outer surface protein A, siehe dazu auch Kapitel 2.5) oder auch einem Ganzzell-Lysat von Borrelien hergestellt. Das OspA ist ein Oberflächenprotein, welches nahezu ausschließlich von Borrelien exprimiert wird, die sich noch in der Zecke befinden. Beim Saugakt nimmt die Zecke das Blut des geimpften Wirtes auf und die darin enthaltenen OspA-Antikörper können an das OspA der Borrelien in der Zecke binden. Die Übertragung der Borrelien auf den Wirt kann so über eine Abtötung oder die Immobilisation der Bakterien verhindert werden (DENNEHY 2001; PAL et al. 2001). In den USA war bis zum Jahr 2002 ein Impfstoff für den Menschen erhältlich. Neben der geringen Akzeptanz in der Bevölkerung und bei Ärzten wurde der Impfstoff auf Grund einer Studie von Markt genommen, die eine impfbedingte autoimmune Arthritis bei einzelnen Patienten feststellte. Ein abschließender Beleg für die Schädlichkeit des Impfstoffes konnte aber nicht erbracht werden (KAMRADT 2002; STEERE et al. 2004).

Für Hunde sind dagegen sowohl in den USA als auch in Europa mehrere Impfstoffe zugelassen, die auf der Basis von Borrelien-Lysaten oder rekombinantem OspA hergestellt werden. In Deutschland ist nur ein Präparat verfügbar, welches aus Lysat von *B. burgdorferi* s.s. mit Adjuvantien hergestellt wird. Auf der Basis einer Veröffentlichung und Dissertation (TOEPFER et al. 2007; TÖPFER 2005) mussten die bisherigen Impfempfehlungen durch den Hersteller revidiert werden. Das bisherige Schema sah eine Erstimpfung der Hunde ab einem Lebensalter von zwölf Wochen vor, die zwei Impfungen im Abstand von drei bis fünf Wochen beinhaltet. Anschließend erfolgte eine jährliche Auffrischungsimpfung vor der Zeckensaison, also von November bis Februar. In den oben genannten Studien wurde jedoch festgestellt, dass die Impf-Antikörpertiter bereits wenige Monate nach der Erstimpfung stark absinken, so dass ein ausreichender Impfschutz nicht mehr gewährleistet werden kann. Deshalb wurde eine dritte Immunisierung etwa sechs Monate nach der Erstimpfung nahegelegt.

Der Impfstoffhersteller empfiehlt dementsprechend nun im ersten Impfstoffjahr neben der Erstimpfung noch eine Herbstimpfung nach vier bis sechs Monaten und anschließend eine jährliche Auffrischungsimpfung ab dem Frühjahr des zweiten Impfstoffjahres. Für gefährdete Tiere wie Jagdhunde oder Hunde, die oft Zecken exponiert sind, wird aber weiterhin eine zusätzliche Herbstimpfung empfohlen. Die Impfung allein bietet in Deutschland aus mehreren Gründen aber keinen ausreichenden Schutz gegen eine Infektion der Hunde. Da der verfügbare Impfstoff aus *B. burgdorferi* s.s. hergestellt wird, aber innerhalb Europas vorwiegend *B. garinii* und *B. afzelii* in Zecken vorkommen, müsste eine gute Kreuzreaktivität der induzierten Antikörper gegeben sein. Studien zeigten allerdings, dass bei der Verwendung von rekombinantem OspA einer Borrelien-Spezies die induzierten Antikörper nicht ausreichend kreuzreaktiv gegenüber heterologen Spezies sind (GERN et al. 1997). Nach dem bisherigen Kenntnisstand kann davon ausgegangen werden, dass weitere prophylaktische Maßnahmen notwendig sind und sich Hunde trotz einer regelmäßigen Impfung mit anderen Spezies des *Bbsl*-Komplexes infizieren könnten. Vor einer Erstimpfung sollte in jedem Fall das Vorkommen von infektionsspezifischen Antikörpern ausgeschlossen werden. Liegen infektionsspezifische Antikörper vor, sollte möglichst keine Impfung, oder diese in jedem Fall erst nach einer antibiotischen Therapie erfolgen.

### Weitere Prophylaxemaßnahmen:

Das tägliche Entfernen der Zecken ist sowohl bei Mensch und Tier eine wichtige weitere Maßnahme, um die Übertragung von Borrelien zu vermeiden, da diese erst 24 bis zu 48 Stunden nach dem Zeckenstich erfolgt (OHNISHI et al. 2001). Für den Menschen stehen eine große Zahl an Präparaten mit Repellenz-Wirkstoffen wie Diethyltoluamid (DEET) oder auch Zedernextrakt zur Verfügung. Bei Hunden werden Akarizide wie Fipronil (Gruppe der Phenylpyrazole) oder Amitraz (Gruppe der Triazapentadiene) verwendet, die wie Fipronil als Spot on-Präparate oder auch Sprühlösung verfügbar sind. Pyrethroide wie Permethrin werden in Kombination mit anderen Ektoziden für einen Knock-Down-Effekt eingesetzt. Auch Repellenzien, die Zecken vom Stich des Wirtstieres abschrecken sollen, kommen zur Verwendung. Hier steht zum Beispiel die große Wirkstoffgruppe der Pyrethroide als Halsbänder zur Verfügung, aber auch ätherische und pflanzliche Öle (UNGEMACH 2006).

Die prophylaktische, antibiotische Therapie nach dem Stich einer vermeintlich infizierten Zecke wird in der Humanmedizin zum Beispiel mit Doxycyclin durchgeführt (NADELMAN et al. 2001), ist aber in der Veterinärmedizin nicht üblich, da die tägliche Zeckenbelastung der Tiere erheblich und die Kosten für eine solche Prophylaxe hoch sind. Mit den drei Schwerpunkten Impfung, dem Entfernen der Zecken und dem Verwenden von Akariziden und Repellenzien kann einer Borrelieninfektion von Hunden allerdings in der Regel erfolgreich vorgebeugt werden.

## 2.5 Mechanismen der Persistenz und Immunevasion

Borrelien enthalten kein Lipopolysaccharid (LPS) (TAKAYAMA et al. 1987), aber tragen auf ihrer Oberfläche eine große Anzahl an Rezeptoren und Oberflächenproteinen (CULLEN et al. 2004; SCHRODER et al. 2008). Einige von ihnen ermöglichen unter anderem in der Funktion hochvariabler Antigene eine Immunevasion und somit das Überleben im Säugetierwirt. Bereits im Mitteldarm der Zecke treten Proteinrezeptoren wie TROSPA (Tick Receptor OspA) in direkten Kontakt mit der Borrelienoberfläche und erleichtern so deren Kolonisation in der Zecke (FIKRIG et al. 2006). Einer der wichtigsten Faktoren des erfolgreichen Wirtswechsels ist der Wechsel der Oberflächenprotein-Expression von OspA (outer surface protein A) zu OspC (SCHWAN et al. 1995b). Zunächst ist im Mitteldarm der Zecke die Expression von OspA essenziell für die Anheftung und Kolonisation der Borrelia (PAL et al. 2000). Die Expression von OspA oder OspC erfolgt aber nicht in einer gegenseitig bedingten Regulation der Proteinexpression. Vielmehr sind auch in der Zecke Borrelia vorhanden, die durchgängig OspA, OspC oder beide Proteine exprimieren (OHNISHI et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine höchst variabel sind (WILSKE et al. 1996b). OspC soll wesentlich für die Fähigkeit der Borrelia sein, die Darmwand der Zecken zu penetrieren und schließlich in deren Speicheldrüsen einzuwandern (TEMPLETON 2004). Andere Untersuchungen weisen hingegen darauf hin, dass OspC erst für die Etablierung einer Infektion im Wirt wesentlich wichtiger ist (GRIMM et al. 2004). Im Speichel der Zecken findet sich das Protein Salp15 (Salvatory protein). Dieses bindet während der Blutmahlzeit der Zecken, kurz bevor die Borrelia mit dem Speichel in den Wirt übertragen werden, an das nun anstatt OspA exprimierte Oberflächenprotein OspC der Borrelia und schützt das Bakterium so später im Wirt gegen dessen spezifische Antikörper-Reaktionen. Des Weiteren wurde kürzlich experimentell gezeigt, dass Salp15 die Borrelia gegen eine Komplement-vermittelte Abtötung im Serum schützen kann (SCHUIJT et al. 2008).

Das Genom der Borrelia ist etwa 1,5 Mb (Megabasen) groß und enthält ein lineares Chromosom sowie neun zirkuläre und zwölf lineare Plasmide (FRASER et al. 1997). Zwei lineare Plasmide, lp25 (25 kb) und lp28-1 (28 kb) sind wichtige Faktoren für das infektiöse Potenzial der Borrelia. Borrelia-Klone mit einer lp25-Defizienz sind nicht infektiös, das Immunsystem des Wirtes eliminiert diese Spirochäten in kurzer Zeit. Dagegen führt das alleinige Fehlen von lp28-1 zu einem Phänotyp, der ein geringeres Disseminationspotenzial im Wirt aufweist, aber generell eine erfolgreiche Infektion induzieren kann (LABANDEIRA-REY et al. 2001; LABANDEIRA-REY et al. 2003; NORRIS et al. 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Borrelia zystenartige Formen annehmen können, die es ihnen ermöglichen, innerhalb kurzer Zeit widrigen oder suboptimalen Umwelteinflüssen zu entgehen (GRUNTAR et al. 2001).

### 2.5.1 Der *vlsE*-Locus und das Oberflächenprotein *VlsE*

Das Protein Vmp (Variable major protein) von *B. hermsii* ist ein Oberflächenlipoprotein, welches einer ständigen Variation seiner Molekülstruktur unterliegt. Die das humane Rückfallfieber verursachenden Bakterien entziehen sich dem Immunsystem des Wirtes über die ständige Variation der Vmp-Proteinoberfläche innerhalb von vier bis sieben Tagen (BARBOUR 1990), was funktional in einer schnellen Antigenvariation und Immunevasion resultiert, da zuvor gebildete Antikörper nicht mehr effektiv binden können. Der Vorgang wird auch als antigenische Variation bezeichnet. Somit werden unter anderem durch Intervalle von Immunreaktionen bzw. Fieberschüben die namhaften Symptome des Rückfallfiebers verursacht. Die Proteinvariation des Vmp basiert auf einer komplizierten Rekombination von Gensegmenten im *vmp*-Locus, die die Basis für immer neue Aminosäuresequenzen bilden (HINNEBUSCH et al. 1998). Variable Proteinsysteme wurden ebenfalls bei anderen Rückfallfieber-verursachenden Borrelien wie *B. duttoni* und auch den Trypanosomen bestätigt (BARBOUR 1990; BURMAN et al. 1990; TABUCHI et al. 2002)

Auch die Lyme-Borreliose-verursachenden Borrelien tragen einen hochvariablen Genlocus, *vls* (VMP-like sequence), welcher ursprünglich ebenso wie das Oberflächenlipoprotein *VlsE* (Variable major protein-like sequence, Expressed) in *B. burgdorferi* s.s. B31 entdeckt wurde (ZHANG et al. 1997). Hier konnte gezeigt werden, dass *vls* auf dem linearen Plasmid lp28-1 codiert wird. Der *vls*-Locus besteht aus einem Expressions-Bereich (*vlsE*) und 15 Kassettenregionen, die sehr homolog zu dem zentralen Bereich von *vlsE* sind. Da die Kassetten keine Promotersequenzen besitzen, werden sie als nicht exprimiert, bzw. als stille Kassetten bezeichnet. Jede dieser stillen Kassetten besitzt sechs variable Regionen (VR1-VR6) und sechs invariable Regionen (IR1-IR6). Die invariablen Regionen sind dabei in allen 15 stillen Kassetten nahezu identisch, wohingegen die variablen Regionen Sequenzunterschiede zwischen ihnen aufweisen. Der *vlsE*-Locus selbst beherbergt noch eine zentrale, 570-bp-große Kassettenregion (*vls1*).

Der Locus *vlsE* unterliegt einer genetischen Variation und segmentalen Rekombination (ZHANG et al. 1998a). Hierbei kommt es zu einem Kopieren von Teilsequenzen der stillen Kassetten in *vlsE* hinein, wobei die dadurch ersetzten *vlsE*-Bereiche verloren gehen. Dies entspricht dem Modell der segmentalen Genkonversion und Rekombination, wie es auch teilweise für den T-Zellrezeptor bekannt ist. Bereits innerhalb von 4 bis 28 Tagen nach der Borrelieninfektion des Wirtes entstehen immer neue *vlsE*-Variationen, die letztendlich in der schnellen Expression neuer antigenischer Varianten des *VlsE*-Oberflächenproteins resultieren (EMBERS et al. 2007c; ZHANG et al. 1998b). Es konnte festgestellt werden, dass diese genetische und antigenische Variation nur bei Borrelien im Wirbeltierwirt, nicht aber bei solchen in der Kultur oder in der Zecke nachzuweisen ist (INDEST et al. 2001; OHNISHI et al. 2003; ZHANG et al. 1998b). Im zeitlichen Verlauf der Infektion eines immunkompetenten Wirtes (murines Modell) unterliegen Borrelienkclone mit einem gegenüber dem parental *vlsE* wenig veränderten Genotyp einer schnelleren Elimination durch das Immunsystem. Dagegen scheint der Druck des adaptiven Immunsystems den stärker veränderten *vlsE*-Klonen einen



Selektionsvorteil zu verschaffen, da ebenso die Varianten des VlsE-Proteins als Antigen schließlich vielfältiger sind (COUTTE et al. 2009). Die Struktur von VlsE selbst, seine Expression auf der Borrelienoberfläche und seine Funktion wurden in den letzten Jahren eingehend untersucht.

VlsE ist 34 kDa groß, hydrophil und vermutlich über einen Lipidanker mit der äußeren Borrelienmembran verbunden. Es weist sechs Variable (VR1-VR6) und sechs invariable Regionen (IR1-IR6) auf, die alternierend angeordnet sind und die variable Domäne des Proteins bilden. Diese wird von den zwei großen konstanten Regionen umschlossen, die jeweils das Carboxy- und N-terminale Ende bilden (EICKEN et al. 2002; LIANG et al. 1999b) (Abbildung 4).

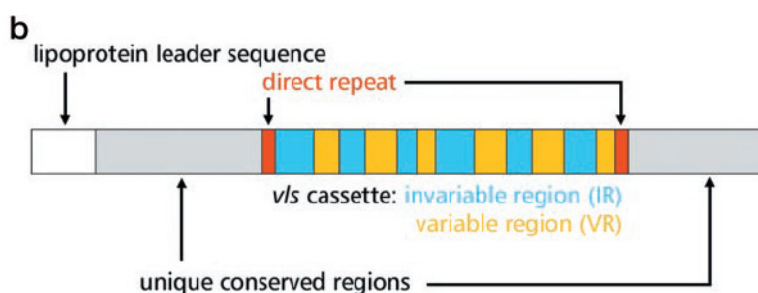


Abbildung 4: Modell der Primärstruktur von VlsE (Eicken et al. 2002)

Bisher wird zudem davon ausgegangen, dass eine antigenische Variation nur in den variablen Regionen stattfindet. Die invariablen Regionen sollen zwischen den Borrelienspezies konserviert sein (LIANG et al. 1999a), was zweifelsfrei bisher nur für *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* bewiesen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die IR deutliche, im Verlauf der Infektion konstant messbare, jedoch nicht protektive Antikörper-Reaktionen hervorrufen. Die IR6 erwies sich als am stärksten immunogen sowohl in Sera infizierter Mäuse, Menschen, Affen als auch Hunde (LIANG et al. 1999a). Auf Grund von detaillierten Analysen der Molekülstruktur konnte gezeigt werden, dass die invariablen Regionen genau wie die konstanten Regionen in dem verdrehten VlsE-Molekül der Proteinoberfläche abgewendet liegen und somit potenziellen Antikörpern nur schwer zugänglich sein müssten (EICKEN et al. 2002; EMBERS et al. 2007b). Dies entspricht in Abbildung 5 den blau und hellgrau gefärbten Flächen des Molekülmodells.

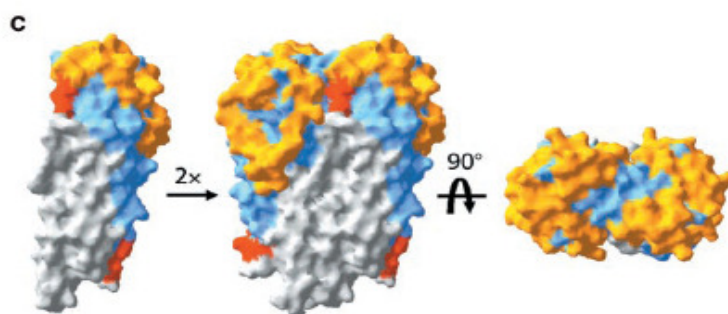


Abbildung 5: Strukturmodell von VlsE mit der Position der VRs (orange); IRs (blau); konstanten Regionen (hellgrau) und Direct Repeats (rot) (EICKEN et al. 2002)

Dennoch werden wie oben beschrieben deutliche Immunreaktionen gegen IR-Regionen und auch gegen konstante Regionen gebildet. Dieses vermeintliche Paradoxon konnte bis heute trotz intensiver

Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Mit seiner Oberflächenvariation der Epitope ermöglicht es VlsE den Borrelien, den zuvor gegen ältere Epitope gebildeten Antikörperpopulationen effektiv zu entgehen und sich so der Elimination dauerhaft zu entziehen. Dementsprechend sind im Serum gemessene Antikörper gegen VlsE und seine invariablen Regionen ein wichtiger Indikator für metabolisch aktive Borrelien im Wirtsorganismus. Deshalb sind VlsE und das synthetische Analogon zu IR6, das C6-Peptid, zu einer wichtigen Ergänzung des serologischen Antikörpernachweises bei Mensch und Hund geworden, da sich besonders C6 als hochspezifischer, leicht herzustellender in-vivo-Infektionsmarker erwiesen hat (siehe Kapitel 2.7.3.3).

## 2.6 Die Immunantwort des Wirtes

Trotz der in Kapitel 2.5 erläuterten vielfältigen Mechanismen der Borrelien, einer effektiven Immunantwort zu entkommen, kann das Immunsystem des Wirtes die Borrelien gerade in der initialen Infektionsphase auch bekämpfen. An der Stichstelle der Zecke und dem umliegenden Gewebe wird zunächst eine unspezifische Immunreaktion gegen die Borrelien ausgelöst, deren lokale Entzündungssymptomatik auch das EM auslösen kann. Dabei spielen einwandernde Immunzellen wie Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten eine große Rolle (LUSITANI et al. 2002). Die Bakterien können teilweise phagozytiert und intrazellulär abgetötet werden, allerdings kann eine Infektion so nicht eliminiert werden (MONTGOMERY et al. 2002). Entsprechend der Pathogenese der Lyme-Borreliose kommt es zu multisystemischen Entzündungsreaktionen in verschiedenen Körpergeweben. Die Produktion von Antikörpern setzt erst etwa zu Beginn der Phase II ein, was auch den frühen serologischen Nachweis bei einer vermuteten Neuinfektion erschwert. Zuerst können nach zwei bis vier Wochen IgM, nach vier bis sechs Wochen dann auch IgG-Antikörper nachgewiesen werden (CRAFT et al. 1984a). Beim Hund konnten experimentell spezifische IgG-Antikörper vier bis sechs Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden, die nach etwa 90 Tagen ihr Maximum erreichten (STRAUBINGER et al. 2000b). Die im Verlauf der Borrelien-Infektion gebildeten Antikörper führen aber nicht zu einer protektiven Immunität (STEERE 2001a; STRAUBINGER et al. 2000b), obwohl sie eine Phagozytose der Borrelien (BENACH et al. 1984) vermitteln und auch die Komplementsystem-aktivierte Lyse hervorrufen können (KOCHI et al. 1991). Im chronischen Stadium der Lyme-Borreliose werden vermehrt T-Lymphozyten in Punktaten von entzündeten Gelenken nachgewiesen (HU et al. 1997). Die Symptome werden in diesem Stadium vorwiegend immunpathologischen Reaktionen zugeschrieben. Die auslösenden Faktoren sind massive Gewebsinfiltrationen von Immunzellen, die wiederum zum Beispiel mit ihrem Mustererkennungsrezeptor TLR-2 (Toll-like-receptor-2) an Borrelien-Oberflächenproteine binden können (HIRSCHFELD et al. 1999), was auch bei anderen, allerdings LPS-tragenden Bakterien eine große Rolle spielt. Zytokinkaskaden unter der Beteiligung von IL-8 sind bekannt, die eine verstärkte Leukozytenmigration in die Gelenke bewirken können (STRAUBINGER et al. 1997a). Die eindeutige Zuordnung der Borrelieninfektion in eine zelluläre (Th-1) oder humorale (Th-2) Immunantwort ist nicht möglich. Es scheinen mehrere T-Zell-aktivierende Faktoren wie IL-4,

besonders aber IL-10 (Th-2), welches die Borrelien supprimieren können (LAZARUS et al. 2008) oder auch Th-1 fördernde Faktoren wie Interferon-Gamma eine Rolle spielen zu können (KANG et al. 1997). Anhand des murinen Lyme-Arthritis-Modells wurde in den letzten Jahren besonders die Kaskade der sogenannten IL23/IL-17-Achse (MCKENZIE et al. 2006) intensiv erforscht. IL-23 führt dabei über eine komplexe Kaskade zu der Induktion von IL-17-abhängigen T-Zellen. IL-17 selbst ist proinflammatorisch und führt zur Schädigung von Knorpelgeweben (LUBBERTS et al. 2001). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass IL-17, induziert durch IL-23, die T-Zell-vermittelte Symptomatik der Lyme-Arthritis (BURCHILL et al. 2003; KNAUER et al. 2007; KOTLOSKI et al. 2008) verursachen kann.

## **2.7 Diagnostik**

### ***2.7.1 Anamnese und Vorbericht***

Eine Infektion mit Borrelien führt nicht zwangsläufig zu der Ausprägung einer klinischen Lyme-Borreliose. Das Vorkommen der klinischen Erkrankung wird oft überbewertet (GREENE et al. 2006). Die Diagnose der Erkrankung kann nur unter Einbeziehung klinischer und labordiagnostischer Untersuchungen erfolgen, weshalb der Vorbericht eine große Bedeutung hat. Dieser muss Faktoren wie Zeckenexposition, Freizeitverhalten, genaue Beschreibung der klinischen Symptomatik, antibiotischer Vorbehandlungen, Impfungen und die Zeckenprophylaxe dokumentieren. Vielfach kann dennoch nur eine Ausschlussdiagnose erfolgen, wenn chronische Leiden wie Lahmheit oder Müdigkeit vorliegen und der positive Nachweis von infektionsspezifischen Antikörpern gelang. Ein positiver Antikörpernachweis allein ist nicht beweisend, aber im Zusammenhang mit einem entsprechenden Vorbericht hinweisend. Spricht der Hund zudem, auch wiederholt, auf eine antibiotische Therapie mit deutlicher Besserung der Krankheitssymptome an, so kann die Verdachtsdiagnose der Lyme-Borreliose gestellt werden.

### ***2.7.2 Direkter Erregernachweis***

Der direkte Erregernachweis ist durch die Untersuchung von Hautbiopsaten, Gelenk- oder Liquorpunktaten, selten aus Blut möglich. Die kulturelle Anzucht von Borrelien aus Körpergeweben oder auch Zecken dauert bis zu sechs Wochen und erfolgt in speziellen Flüssignährmedien wie BSK-II (BARBOUR 1984). Die Medien sind sehr nährstoffreich, deshalb muss durch steriles Arbeiten die Kontamination mit Sekundärkeimen vermieden werden, da so ein Wachstum der Borrelien verhindert wird. Der direkte Nachweis von Borrelien-DNA mittels einer PCR in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung (ROSA et al. 1989) ist sehr sensitiv und spezifisch, mittlerweile durch das Verfahren der quantitativen real-time PCR (PAHL et al. 1999; STRAUBINGER 2000a) sehr schnell und kann aus vielen Körpergeweben erfolgen. Die PCR ermöglicht je nach Wahl des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes auch die Speziesidentifizierung. Allerdings kann so nicht zwischen lebenden und toten Organismen unterschieden werden (GREENE et al. 2006; STEERE 2001a). Sowohl die Kultivierung, als auch die PCR sind in der Routinediagnostik begrenzt anwendbar. Die Wahl des zu

untersuchenden Körpergewebes ist wesentlich, da die genaue Stichstelle der Zecke oft nicht mehr lokalisierbar ist und der Nachweis in einer beliebigen Gewebeprobe oder einem Punktat oft erfolglos bleibt. Zudem muss gerade bei chronischen Infektionen, bei denen eine Erregerdissemination vermutet werden kann, mit einer Erregerlast unterhalb der Detektionsgrenzen gerechnet werden. Somit können beide Nachweismethoden zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Auf Grund des sowohl in Human- als auch Veterinärmedizin vorhandenen Bedarfs an schnellen labordiagnostischen Methoden, die kostengünstig und sensitiv sind, wird in der Routinediagnostik oft nur der indirekte Antikörpernachweis in Körperflüssigkeiten (Serologie) durchgeführt. Weitere Methoden für den direkten Erregernachweis bieten die Darstellung der Erreger mit Hilfe fluoreszierender Antikörper, dem Elektronenmikroskop oder auch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Bei der FISH-Technik hybridisieren einsträngige DNA-Sonden, die an einen Farbstoff, zum Beispiel FITC gekoppelt sind, im positiven Fall mit der Borrelien-DNA. Die einzelnen Borrelienzellen fluoreszieren bei Betrachtung im Mikroskop (HAMMER et al. 2001).

### **2.7.3 Serologische Diagnostik**

Sowohl in Human- als auch Veterinärmedizin ist der indirekte Antikörpernachweis gegen Borrelien als schnelle, kostengünstige und sensitive Nachweismethode beliebt. Je nach Labor existieren oft unterschiedlichste Protokolle, die die Ergebnisse untereinander schwer vergleichbar machen. Zudem erschweren sehr sensitive Tests durch das Erfassen kreuzreaktiver Antikörper gegenüber anderen Erregern wie Leptospiren oder Treponemen (BRUCKBAUER et al. 1992) die Vermeidung falsch-positiver Testergebnisse. Wie unter Kapitel 2.6 beschrieben, setzt die Produktion von Antikörpern gegen Borrelien im Vergleich zu anderen Erregern erst spät ein. Diese können mittels indirektem IFAT (Immunfluoreszenz-Assay-Test), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), oder Western-Blot nachgewiesen werden. Neben dem labordiagnostischen Nachweis stehen auch viele Schnelltests für den Praxisgebrauch zur Verfügung, die zumeist auf ELISA oder IFAT-Technik basieren. Diese können aber unter anderem auf Grund von Interpretationsgrenzen den labordiagnostischen Nachweis noch nicht ersetzen. Der IFAT wurde nach der Entdeckung von *B. burgdorferi* recht schnell etabliert (MAGNARELLI et al. 1987) und verwendet vollständige Borrelienzellen als Antigen, hat sich aber auf Grund der oft zu geringen Spezifität und mangelnder Vergleichbarkeit der Ergebnisse als ungeeignet erweisen (CRAFT et al. 1984b).

Der moderne serologische Nachweis mittels ELISA und anschließendem Western-Blot erfolgt im sogenannten Zweistufentest, welcher nach wie vor die Methode der Wahl darstellt (STEERE et al. 2008). Mit einem sensitiven ELISA können so zunächst viele Proben schnell und kostengünstig untersucht werden. Darauf folgt im Falle eines positiven Ergebnisses die Spezifizierung der Immunreaktionen mit einem Western-Blot, durch den Reaktionen gegen Borrelienproteine visualisiert werden können. ELISA und Western-Blot können auf der Basis von rekombinant hergestellten Borrelien-Antigenen, oder auch mit Borrelien-Lysat-Antigenen durchgeführt werden. Der Vorteil der

rekombinanten Proteine ist eine sehr hohe Spezifität, die im Gegensatz zu Ganzzell-Borrelien-Lysat-Antigenen aber zu Lasten der Sensitivität geht.

### **2.7.3.1 ELISA im Zweistufentest**

Der ELISA erlaubt bei der Verwendung von Borrelien-Antigen die Detektion von Serumantikörpern vom Typ IgM oder IgG gegen diese Bakterien (CRAFT et al. 1984b; MAGNARELLI et al. 1988). Nach der Inkubation von Antigen und Serum in einer Kavität wird ein Enzym-markierter Sekundärantikörper aufgetragen. Dieser kann an vorhandene Serumantikörper (Primärantikörper) binden. Mittels eines umzusetzenden Substrats kann nun im positiven Fall eine Farbentwicklung gemessen werden. Deren Intensität korreliert mit der Antikörperkonzentration und wird photometrisch bestimmt sowie statistisch ausgewertet. Bei der Wahl von rekombinant hergestellten Antigenen ist der ELISA bereits sehr spezifisch, wobei heute meist Kombinationen von infektionsspezifischen Proteinen gewählt werden (MAGNARELLI et al. 1997). Neuere Testsysteme arbeiten erfolgreich mit hochspezifischen Peptiden wie dem aus VlsE gewonnenen C6-Peptid. Auch VlsE selbst eignet sich als hochspezifischer Infektionsmarker für die Verwendung in kommerziellen Testsystemen (MARANGONI et al. 2008). Kürzlich wurde auch ein ELISA unter der Verwendung von einem Peptid beschrieben, welches auf OspC basiert und die Borreliose-Frühdagnostik erleichtern soll (JOBE et al. 2008). Die Verwendung von Borrelien-Ganzzell-Lysaten als Antigen erhöht die Sensitivität, was gerade bei der Untersuchung von grenzwertigen Fällen in potenziellen Endemiegebieten, unklaren Vorberichten oder der Kontrolle von Impfantikörperspiegeln in der Veterinärmedizin von Bedeutung ist. Dazu kann eine Kombination aus Ganzzell-Lysaten und rekombinanten OspA verwendet werden, damit auch Impfreaktionen sicher erfassbar sind (TOEPFER et al. 2007). Im positiven Fall muss aber entsprechend des Zweistufentests die Spezifizierung und qualitative Bewertung der Immunantwort im Western-Blot erfolgen, um zwischen unspezifischen Reaktionen, Infektionen oder gar Impfungen zu unterscheiden. Dies ist auch trotz der Anwendung von rekombinanten Antigenen oft nötig, um eine Infektion sicher auszuschließen.

### **2.7.3.2 Western-Blot im Zweistufentest**

Durch eine Inkubation von Seren auf einer Membran, die mit der Größe nach aufgetrennten Borrelien-Antigenen beschichtet ist, kann eine Spezifizierung der Immunantwort erfolgen. Die Proteine, zumeist aus Borrelien-Lysat gewonnene Lösungen, werden zuvor elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran transferiert. Gerade im kommerziellen Bereich kommen auch rekombinante Proteine zum Einsatz (HAUSER et al. 1998), die in der Regel auf die Membran aufgesprüht werden. Die Detektion der Immunreaktion erfolgt mittels eines enzymgekoppelten Antikörpers, die Anfärbung erfolgt durch Substrat und anschließender Inkubation. Somit ergibt sich ein hochspezifisches Proteinbandenmuster (siehe Tabelle 2), dessen Charakter abhängig von dem verwendeten Antigen bzw. der Borrelienspezies und von der Detektion von IgM oder IgG ist. Basierend auf den Kenntnissen über das unterschiedliche Vorkommen der relevanten

Borrelienspezies in Europa und den USA wird der Nachweis der entsprechenden Antikörpern mit unterschiedlichen Antigenpräparationen empfohlen (STEERE et al. 2008). In Europa ist dies die Verwendung von *B. garinii* oder *B. afzelii* in Form von Lysat-Antigenen (HAUSER et al. 1998; HAUSER et al. 1999). Dabei sollten möglichst die Stämme *B. afzelii* PKo oder *B. garinii* PBI verwendet werden. Es zeigte sich, dass der Lysat-Antigen-Western-Blot basierend auf *B. afzelii* PKo bisher am sensitivsten war (HAUSER et al. 1999). In diesen Studien wurden ebenfalls Empfehlungen über die heranzuziehenden Proteinbanden gegeben. Im Fall des *B.-afzelii*-PKo-basierten IgG-Western-Blots ist dieser bei Vorliegen von zwei oder mehr Signalen für p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC (p23), p21, p17 und p14 als positiv zu bewerten. Wird ein IgM-detektierender *B.-afzelii*-PKo-Western-Blot verwendet, so genügen je mindestens eine Bande für p39 und OspC, da früh Antikörper gegen diese Borrelienantigene gebildet werden. Die Detektion von IgM im Western-Blot kann auf Grund der geringeren Sensitivität in verschiedenen klinischen Stadien der Erkrankung gegenüber dem Nachweis von IgG nur eingeschränkt empfohlen werden (HAUSER et al. 1999).

Tabelle 2: Proteinbanden eines Western-Blots mit *Borrelia*-Lysat-Antigen

Bezeichnung	Größe in kDa	Spezifität / Funktion
p14	14	sehr spezifisch, unbekannte Funktion
p17	17	sehr spezifisch, Oberflächenprotein
p21	21	sehr spezifisch, unbekannte Funktion
OspC	21-23	sehr spezifisch, Oberflächenprotein
p30	30	sehr spezifisch, unbekannte Funktion
OspA	31-33	sehr spezifisch, Oberflächenprotein
OspB	34-36	mittelgradig spezifisch, Oberflächenprotein
p39 (BmpA)	39	mittelgradig spezifisch, Membranprotein
p41	41	wenig spezifisch, kreuzreaktiv mit Bakterien außerhalb des Genus <i>Borrelia</i> , Flagellin
p43	43	sehr spezifisch, unbekannte Funktion
p58	58	sehr spezifisch, unbekannte Funktion
p66	66	sehr spezifisch, membranassoziiertes Protein
p60, p75	60 - 75	wenig spezifisch, Kreuzreaktionen mit Proteinen anderer Bakterien, Hitzeschockproteine
p83 - p100	83 - 100	hoch spezifisch, mit dem proteoplasmatischen Zylinder oder dem Flagellum assoziiert

### 2.7.3.3 Das C6-Peptid-Testsystem

Die invariable Region 6 (IR6) des infektionsspezifischen Oberflächenproteins VlsE erwies sich im Vergleich zu anderen invariablen Regionen wie IR2 oder IR4 als diejenige mit dem höchsten Antigenpotenzial, was mit Sera infizierter Menschen, Affen, Hunde und Mäuse bewiesen wurde (LIANG et al. 1999b). Das auf der Basis von IR6 entwickelte, 25 Aminosäuren lange Peptid C6 wurde daraufhin erfolgreich in ELISA-Testsystemen zum Nachweis von humanen Infektionen eingesetzt (LIANG et al. 1999c). Hier zeigte sich das C6-Peptid bereits in frühen Stadien der Lyme-Borreliose des Menschen als sensitiv. Zudem konnten keinerlei Kreuzreaktivitäten gegenüber impfspezifischen OspA-Antikörpern festgestellt werden, was die Verwendung zur serologischen Untersuchung des Hundes sehr attraktiv machte. Weitere Studien bestätigten diesen Sachverhalt bei der Untersuchung von geimpften Hunden (LEVY 2002b; LIANG et al. 2000b). Hier konnte bei experimentell infizierten Tieren auch gezeigt werden, dass bereits innerhalb der ersten drei Wochen nach der Infektion C6-Antikörperspiegel messbar waren. Damit kann eine Infektion bereits wesentlich früher diagnostiziert werden als mittels der bisherigen Testantigene auf Lysat-Antigen-Basis. Die C6-Antikörperspiegel erwiesen sich zudem während des Beobachtungszeitraums von über 600 Tagen als konstant hoch. Ein wesentlicher Vorteil der C6-Diagnostik zeigt sich in der Erkenntnis, dass die C6-Antikörperspiegel nach einer gezielten antibiotischen Therapie im empfohlenen Regime deutlich messbar und dauerhaft bis unter die Nachweisgrenze absinken können (PHILIPP et al. 2001). Dies konnte für Menschen und Hunde klar belegt werden, wobei das Absinken der C6-Antikörper bei Patienten, die bereits mehrfach vorbehandelt waren, nicht so mehr so deutlich ausfiel (FLEMING et al. 2004). Damit ist die Stärke des Absinkens der C6-Antikörperspiegel bei Mensch und Hund vermutlich von der Höhe der Antikörperspiegel vor der Therapie abhängig (FLEMING et al. 2004; LEVY et al. 2008). Veröffentlichte Studien, die dies für Hunde aus Europa, respektive Deutschland belegen, fehlen bisher. Für die serologische Untersuchung des Hundes wurde ein inzwischen kommerziell auch in Deutschland erhältlicher C6-Schnelltest auf der Basis von ELISA-Technologien entwickelt, welcher besonders in der Tierarztpraxis den schnellen Nachweis von IgG und IgM-Antikörpern ermöglichen soll (LEVY et al. 2002a). Mit diesem semiquantitativen Test wurden in einer eigenen Studie (KRUPKA et al. 2007) über 5000 Hundesera aus Deutschland untersucht, die im Rahmen verschiedenster Fragestellung von Tierärzten zu labordiagnostischen Untersuchungen entnommen wurden. Die Seroprävalenz für *B. burgdorferi* lag bei 9,7 %. Dieser Wert spiegelt, unabhängig von der Frage nach klinischen Symptomen oder Vorbehandlungen, eine erste Einschätzung des Vorkommens von hochspezifischen Antikörpern gegen *B. burgdorferi* bei so vielen Hunden aus Deutschland wider. Die regionale Verteilung der C6-Antikörper zeigt Abbildung 6. Die regionalen Unterschiede waren statistisch signifikant, wenngleich aus den nordöstlichen Bundesgebieten weniger Proben untersucht werden konnten. Zusätzlich wurden mit dem Schnelltest Antikörper gegen den Erreger der kaninen granulozytären Ehrlichiose, *Anaplasma phagocytophilum* erfasst (DUMLER et al. 2001; GREIG et al. 2006). *A. phagocytophilum* wird genau wie *B.*

*burgdorferi* durch Schildzecken übertragen. Studien aus Deutschland konnten Koinfektionen von Zecken mit *B. burgdorferi* und *A. phagocytophilum* belegen (BAUMGARTEN et al. 1999; FINGERLE et al. 1999).

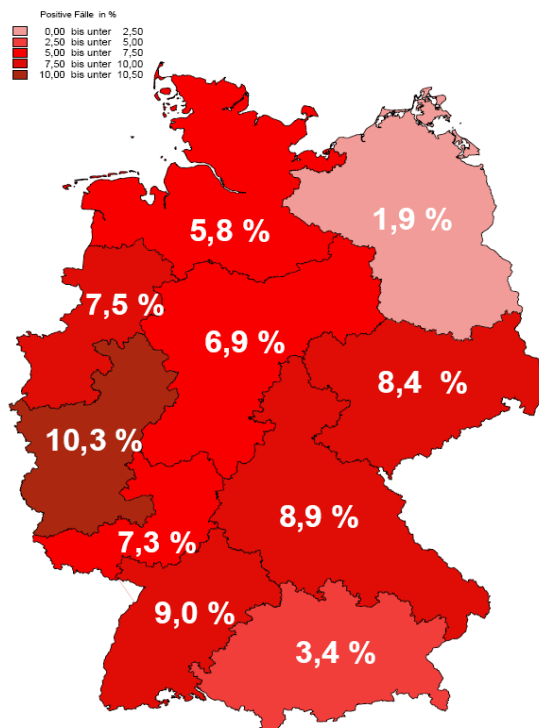


Abbildung 6: C6-Seroprävalenzen in kaninen Serumproben aus Deutschland (KRUPKA et al. 2007)

Über die klinische Relevanz und das Vorkommen von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* in Deutschland ist noch recht wenig bekannt. In dieser Studie (KRUPKA et al. 2007) wurde gezeigt, dass 21,5 % der Hunde Antikörper gegen *A. phagocytophilum* tragen, sowie Antikörper gegen *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* gleichzeitig nur 3,1 % der untersuchten Hunde.

Mittlerweile ist in Deutschland ein auch C6-ELISA für die laborinterne Diagnostik beim Hund verfügbar. Dieser soll in Folge eines positiven C6-Schnelltests und einer eingeleiteten Antibiose den Verlauf der C6-Antikörper quantitativ messen und somit helfen, den Therapieerfolg zu überwachen. Als ein Therapieerfolg wird eine Reduktion der C6-Antikörper um ca. 50 % gewertet, sofern die initialen Antikörpertiter nicht zu niedrig lagen (ANON.VET MED LABOR 2008). Aktuell wird besonders in humanmedizinischen Fachkreisen kontrovers über die Möglichkeit diskutiert, das aufwendigere Zweistufentestsystem gänzlich durch einstufige C6-Testsysteme zu ersetzen (STEERE et al. 2008; WEINSTEIN 2008). Zusätzlich stellt sich die Frage, ob die Speziesdiversität der Borrelien in Europa die Sensitivität des C6-Testsystem beeinflusst. Am intensivsten wurde das Mutterpeptid VlsE von *B. burgdorferi* s.s. untersucht. Mittlerweile konnten auch die *vls*-Loci von *B. garinii* und *B. afzelii* (Stamm ACAI) bezüglich der Homologie zu *B. burgdorferi* s.s. (Stamm B31) analysiert werden (WANG et al. 2003; WANG et al. 2001). Die Autoren fanden Aminosäure-Homologien von 50 bis 65 %, sowie den ähnlichen strukturellen Aufbau von variablen und invariablen Kassetten. *vlsE* selbst wurde aber nicht detailliert untersucht, es wurde aber auf eine



Spezieshomologie geschlossen. Studien legen nahe, dass IR6 (folglich auch C6) zwischen den Borrelienspezies konserviert ist (IYER et al. 2000; LIANG et al. 2000a), was für *B. burgdorferi* und *B. garinii*, jedoch bisher nicht für *B. afzelii* belegt wurde. Inzwischen wurde gezeigt, dass Unterschiede von vier bis fünf Aminosäuren in der Sequenz von IR6 zwischen *B. afzelii* PKo, *B. garinii* PBi und *B. burgdorferi* s.s. B31 existieren, der allgemeine Aufbau des *vlsE*-Locus ist aber identisch (GOTTNER et al. 2004). Einige Studien zeigten, dass mittels IR6/C6-Peptidsequenzen basierend auf *B. garinii* und auch *B. burgdorferi* s.s., Antikörperreaktionen gegen *B. burgdorferi* s.s., teilweise auch *B. garinii* bei Mensch und Hund erfasst werden können (LEVY 2002; O'CONNOR et al. 2004; STEERE et al. 2008) und gute Kreuzreaktivitäten vorhanden sind. Lediglich eine Studie bestätigt dies unter Verwendung von *B.-garinii*-C6 auch für Antikörper von experimentell mit *B.-afzelii*-infizierten Mäusen (LIANG et al. 2000a). Wenige Daten existieren bisher, die C6-Peptide mit Sequenzen aus *B. afzelii* verwendeten. Eine Untersuchung von humanen Sera aus Finnland und den USA (SILLANPAA et al. 2007) ergab, dass mit C6-Peptiden von *B. afzelii* die Detektion von C6-Antikörper in amerikanischen Sera ausreichend sensitiv war. Dagegen konnten mit *B. garinii*-basierten C6-Peptiden Antikörper gegen *B. afzelii* nicht effektiv detektiert werden. Andere Autoren untersuchten Sera von schwedischen Borreliose-Patienten mit C6-Peptiden von *B. burgdorferi* s.s. B31, *B. afzelii* ACAI und *B. garinii* PBi (TJERNBERG et al. 2009). Die C6-Peptide reagierten unterschiedlich auf Serumantikörper, wobei *B. burgdorferi*-s.s.-C6 (IR6) sehr sensitiv war. Die Nutzung eines C6-Peptid-Gemisches verschiedener Spezies wurde empfohlen. Die Verwendung eines einzigen C6-Peptids basierend auf einer Borrelienspezies wurde in einer weiteren Veröffentlichung ebenfalls kritisch bewertet, bzw. eine genaue Überprüfung der heterologen Sensitivitäten gefordert (GOMES-SOLECKI et al. 2007).

### 3 Tiere, Material und Methoden

#### 3.1 Tiere

##### *3.1.1 Tiere der serologischen Studie*

Für die Studie wurden neun Tierarztpraxen aus dem Kundenstamm der institutsinternen Borreliosedagnostik (Arbeitsgruppe Dr. Reinhard K. Straubinger, Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig) um ihre Teilnahme gebeten. Da je Tierarztpraxis 50 bis 80 Blutproben von Hunden entnommen werden sollten, wurden Praxen mit einem ausgebauten Kleintierkundenstamm in die Studie einbezogen. Zudem sollten die Tierarztpraxen in möglichst dem gesamten Bundesgebiet regional verteilt sein. Die Anzahl der Tierarztpraxen sowie Zahl der dort untersuchten Hunde sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die insgesamt 510 untersuchten Hunde stammten vorwiegend aus privaten Haushalten, aus privaten Hundezuchten oder öffentlichen Tierheimen. Die Hundebesitzer wurden bei einem Besuch in der Tierarztpraxis, welcher aus diversesten Gründen erfolgte, von den Tierärzten um die Teilnahme an der Studie gebeten.

Tabelle 3: Tierarztpraxen und dort untersuchte Hunde in der Übersicht

<b>Tierarztpraxis-Nr.</b>	<b>Postleitzahl und Ort</b>	<b>Untersuchte Hunde</b>
1	22339 Hamburg	51
2	28259 Bremen	77
3	26169 Friesoythe	87
4	33818 Leopoldshöhe	27
5	49221 Düsseldorf	87
6	99089 Erfurt	27
7	65428 Rüsselsheim	43
8	94428 Eichendorf	30
9	72770 Reutlingen-Ohm	81
Gesamtzahl untersuchter Hunde:		510

Name und Anschrift der Hundebesitzer, sowie eine schriftliche Einverständniserklärung über die Blutentnahmen und eine eventuelle antibiotische Therapie der Hunde durch die behandelnden Tierärzte wurden ebenfalls erfasst. Es erfolgte keine Selektion der Tiere bezüglich des Geschlechts, der Herkunft oder der Rasse der Hunde. Da eine größere Menge Vollblut entnommen werden sollte, wurden nur Hunde im Alter von mindestens sechs Monaten in die Studie eingeschlossen. Die Hunde durften nicht mit Immunsuppressiva vorbehandelt sein, damit der Antikörpernachweis uneingeschränkt möglich war. Anhand von Fragebögen, die den Tierärzten zugesendet wurden, sollten Daten bezüglich des Gesundheitszustandes der Hunde erfasst werden. Die Fragen

beinhalteten die Anschrift des Tierhalters, sowie Angaben zum Hund mit Name, Tätowier- oder Chipnummer, Rasse, Geschlecht und Geburtsdatum. Ebenfalls wurde der Impfstatus gegen eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. (Lyme-Borreliose-Impfung) erfragt. Es sollten die letzte bekannte Lyme-Borreliose-Impfung mit Monat und Jahr sowie der Gesamtzeitraum der durchgeführten Lyme-Borreliose-Impfungen angegeben werden. Zudem wurde nach einer innerhalb der letzten zwei Jahre erfolgten antibiotischen Therapie gefragt. Sofern diese Frage bejaht wurde, sollten Zeitraum der Therapie, Präparat, Wirkstoff und Behandlungsgrund angegeben werden. Zuletzt sollte der allgemeine Gesundheitsstatus der Hunde am Tag der Blutentnahme sowie eventuelle Krankheitssymptome kurz erläutert werden. Waren einige Angaben der Tierarztpraxen nicht vollständig oder missverständlich, so erfolgte eine telefonische Abklärung und Datenerhebung.

### ***3.1.2 Tiere im Infektionsversuch***

Bei den verwendeten Versuchstieren des Infektionsversuches handelte es sich um weibliche Mäuse des Stammes C3H/HeN vom Wildtyp. Diese Mäuse wurden bereits in einer großer Anzahl wissenschaftlicher Studien (MOODY et al. 1995; MOODY et al. 1998) als Modelltiere zur Erforschung der Lyme-Borreliose verwendet, da sie sowohl für die Infektion mit Borrelien, als auch für die Ausbildung einer so verursachten Arthritis empfänglich sind. Für die Versuche lagen genehmigte Tierversuchsanträge beim Regierungspräsidium Leipzig vor (Aktenzeichen 24-9168.11, Tierversuchsvorhaben Nr: TVV 16/03, 2006). Die Mäuse wurden im Alter von vier Wochen von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Während der gesamten Versuchsdauer erfolgte die Haltung unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in der Tierversuchsanlage des Max-Planck-Institutes für Evolutionäre Anthropologie in Leipzig. Insgesamt wurden für die Studie 173 Mäuse gehalten, wovon schließlich die Daten von 142 Mäusen in die vorliegende Arbeit einbezogen werden konnten.

## 3.2 Material

### 3.2.1 Reagenzien

Eine Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Reagenzien und weiterer Materialien findet sich in den Tabellen E1 bis E10 im Anhang Tabellen.

### 3.2.2 Puffer/Lösungen

#### *PBS 10-fach konzentriert (10X)*

Natriumchlorid	85,00 g
Kaliumhydrogenphosphat	3,54 g
Natriumhydrogenphosphat	14,80 g
Aqua dest. ad	1000,00 ml
Sterilfiltration durch 0,2-µm Filter.	

#### *PBS 1-fach konzentriert (1X)*

PBS 10X	100,00 ml
Aqua dest.	900,00 ml
Sterilfiltration durch 0,2-µm Filter	

#### *PBS-Tween (PBST) mit 0,05 % Tween*

PBS 1X	250,00 ml
Tween 20	125,00 µl

#### *10 % SDS*

SDS	0,30 g
Aqua dest.	2,85 ml

#### *Coomassie Brilliant-Blue Färbelösung*

Methanol	90,00 ml
Aqua dest.	90,00 ml
Geeste Essigsäure	20,00 ml
Coomassie Brilliant-Blue R250	0,50 g

### 3.2.3 Puffer/Lösungen für den Lysat-Antigen-ELISA

#### *1 M Natriumcarbonat*

Natriumcarbonat	53,00 g
Aqua dest. ad	500,00 ml

#### *1 M Natriumbicarbonat*

Natriumbicarbonat	84,00 g
-------------------	---------

Aqua dest. ad 1000,00 ml

### **0,1 M Karbonatpuffer**

1 M Natriumbicarbonat 71,30 ml

1 M Natriumcarbonat 28,00 ml

Aqua dest. 800,00 ml

Den pH-Wert mittels Salzsäure bzw. Natriumhydroxid auf pH = 9,6 einstellen

Aqua dest. ad 1000,00 ml

### **CO<sub>3</sub>/ME/SDS-Lösung**

CO<sub>3</sub> (Carbonatpuffer pH = 9,6) 25,00 ml

β-Mercaptoethanol (ME) 500,00 µl

10 % SDS 500,00 µl

### **PBSTM mit 2 % Milch**

Magermilchpulver 2,00 ml

PBST ad 100,00 ml

## **3.2.4 Puffer/Lösungen für die SDS-PAGE und den Lysat-Antigen Western-Blot**

### **1,5 M Tris**

CO<sub>3</sub> (Carbonatpuffer pH = 9,6) 25,00 ml

β-Mercaptoethanol (ME) 500,00 µl

10 % SDS 500,00 µl

Den pH-Wert mittels 6 N und 1 N Salzsäure auf pH = 8,8 einstellen.

Aqua dest. qs. 1000,00 ml

Sterilfiltration mit einem 0,2-µm Filter.

### **0,5 M Tris**

Tris Base 60,00 g

Aqua dest. ad 800,00 ml

Den pH-Wert mittels 6 N und 1 N Salzsäure auf pH = 6,8 einstellen.

Aqua dest. qs. 1000,00 ml

Sterilfiltration mit einem 0,2-µm Filter.

### **Bromphenol-Blau-Lösung 0,5 %**

Bromphenol-Blau 0,50 g

Aqua dest. ad 100,00 ml

Sterilfiltration mit einem 0,2-µm Filter, Aufbewahrung lichtgeschützt.

### **2X Probenpuffer (ohne Glyzin)**

0,5 M Tris 25,00 ml

β-Mercaptoethanol 10,00 ml

0,5 % Bromphenol-Blau	5,00 ml
Aqua dest. ad	10,00 ml
Sterilfiltration mit einem 0,2-µm Filter, Aufbewahrung lichtgeschützt. Vor Gebrauch wird der Puffer (2X) zu gleichen Teilen mit 10 % SDS vermischt.	

**0,1 % SDS Overlay-Puffer**

SDS	0,40 g
Aqua dest.	400,00 ml

**10 % APS**

APS	0,10 g
Aqua dest.	0,95 ml

**Overlay-Puffer**

1,5 M Tris	6,00 ml
10 % SDS	240,00 µl
Aqua dest.	17,86 ml

**Waschpuffer**

0,5 M Tris	5,00 ml
10 % SDS	200,00 µl
10 % APS	400,00 µl
Aqua dest.	14,72 ml

**Laufpuffer**

Glyzin	57,70 g
Tris Base	12,00 g
SDS	4,00 g
Aqua dest.	4000,00 ml

**Transferpuffer**

Glyzin	57,60 g
Tris Base	12,08 g
Methanol	800,00 ml
Aqua dest. ad	3200,00 ml

**TBS (Tris gepufferte Salzlösung) pH = 7,5**

Natriumchlorid	58,44 g
Tris Base	4,84 g
Aqua dest. ad	1800,00 ml

**TBS (Tris gepufferte Salzlösung) pH = 10**

Natriumchlorid	17,00 g
----------------	---------

Tris Base	2,42 g
Aqua dest. ad	2000,00 ml

***TBST (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween) pH = 7,5 oder pH = 10***

TBS pH = 7,5 oder pH = 10	500,00 ml
Tween 20	250,00 µl

***3 % Gelatine in TBST pH = 7,5***

TBST pH = 7,5	450,00 ml
Gelatine vom Schwein	15,00 g
TBST pH = 7,5 ad.	500,00 ml
Lösen unter ständigem Rühren bei 37 °C, 20 min bei 21 °C Autoklavieren	
Tween 20	250,00 µl

***1 % Gelatine in TBST pH = 7,5***

TBST pH = 7,5	950,00 ml
Gelatine vom Schwein	10,00 g
TBST pH = 7,5 ad	1000,00 ml
Lösen unter ständigem Rühren bei 37 °C, 20 min bei 21 °C Autoklavieren	
Tween 20	250,00 µl

***Trenngel-Lösung, 12 % (für SDS-PAGE)***

Acrylamid	12,00 ml
Aqua dest.	10,00 ml
1,5 M Tris	7,46 ml
10 % SDS	300,00 µl
Leicht Schwenken und für 10 min mittels einer Vakuumpumpe entgasen.	
10 % APS	40,00 µl
TEMED	64,00 µl

***Sammelgel-Lösung, 5 % (für SDS-PAGE)***

Acrylamid	1,25 ml
Aqua dest.	6,06 ml
0,5 M Tris	2,50 ml
10 % SDS	100,00 µl
Leicht Schwenken und für 10 min mittels einer Vakuumpumpe entgasen.	
10 % APS	60,00 µl
TEMED	40,00 µl

### **3.2.5 Puffer/Lösungen für die DNA-Extraktion (Phenol-Chloroform-Fällung)**

#### **Verdauungspuffer**

Natriumchlorid	0,58 g
Tris Base	0,16 g
EDTA	0,93 g
SDS	0,50 g
Aqua dest.	98,00 ml

#### **Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 24:24:1**

Phenol (Tris gepuffert)	12,00 ml
Chloroform	12,00 ml
Isoamylalkohol	0,50 ml

#### **3 M Natriumacetat**

Natriumacetat	2,46 g
Aqua dest.	10,00 ml

Den pH-Wert mit Essigsäure auf 5,25 einstellen, anschließende Sterilfiltration mit 0,2-µm Filter.

#### **70 % Ethanol**

Ethanol 99,8 % (HPLC)	700,00 ml
Aqua dest.	300,00 ml

### **3.2.6 Puffer/Lösungen für die Gelelektrophorese (PCR-Produkte)**

#### **10X TBE für die Gelelektrophorese**

Tris Base	108,00 g
Borsäure	55,00 g
EDTA	7,20 g
Aqua dest. ad	1000,00 ml

#### **1X TBE**

10X TBE	100,00 ml
Aqua dest.	900,00 ml

#### **Agarose-Gel 1,6 %**

1X TBE	200,00 ml
Agarose	3,20 g



**3.2.7 Medien für die Borrelienzucht****Modifiziertes Barbour-Stoennen-Kelly-Medium (BSK-II)**

Aqua bidest.	900,00 ml
Hepes	6,00 g
Natriumcitrat	0,70 g
Neopepton	5,00 g
D+-Glukose	5,00 g
Natriumpyruvat	0,80 g
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,40 g
Natriumhydrogencarbonat	2,20 g
TC Hefeextrakt	2,60 g
Bovines Serumalbumin	50,00 g
Aqua bidest.	900,00 ml
Für 3 h unter Rühren lösen.	
CMRL 1066 10X Medium	100,00 ml
Kaninchenserum	96,00 ml
(hitzeinaktiviert 56 °C, 45 min)	
Den pH-Wert kontrollieren, eventuell auf 7,5 einstellen. Anschließende Sterilfiltration.	
Gelatine vom Rind (steril) (14,4 g in 100,00 ml Aqua dest. gelöst, autoklaviert 15 min 115 °C)	100,00 ml

**MKP-Medium (Modifiziertes Kelly-Pettenkofer-Medium)**

Aqua bidest.	900,00 ml
CMRL 1066 10X Medium	100,00 ml
Neopepton	3,00 g
Hepes	6,00 g
Natriumcitrat	0,70 g
D+-Glucose	3,00 g
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,40 g
Natriumhydrogencarbonat	2,00 g
Den pH-Wert mit 5 N Natriumhydroxid auf 7,6 einstellen. Anschließende Sterilfiltration.	
Bovines Serumalbumin (35 %)	35,00 ml

Kaninchenserum (steril, hitzeinaktiviert)	70,00	ml
Gelatine vom Rind (steril) (14,4 g in 100,00 ml Aqua dest. gelöst, autoklaviert 15 min. 115 °C)	200,00	ml

***Modifiziertes BSK-H Medium***

BSK-H Medium	500,00	ml
Bovine Gelatine steril (siehe BSK-II)	50,00	ml
Kaninchenserum, hitzeinaktiviert, steril filtriert	43,00	ml

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Methoden der serologischen Studie

##### 3.3.1.1 Blutentnahme, Versand und Serumgewinnung

Die Technik der intravenösen Blutentnahme wurde den Tierärzten freigestellt, jedoch wurden zu diesem Zweck jeder Praxis 9-ml-Monovetten zugesandt. Je Hund sollten 18 ml Vollblut entnommen werden, damit daraus ca. 9 ml Serum gewonnen werden konnten. Die Proben wurden gekühlt oder gefroren, als Vollblut oder bereits als vor Ort hergestelltes Serum mit beiliegendem Fragebogen und der Einverständniserklärung des Tierhalters an das Institut für Immunologie in Leipzig zurück gesendet. Sofern Vollblut eingesandt wurde, erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 15 °C und  $3500 \times g$ . Der Serumüberstand wurde anschließend entnommen und zu jeweils 1,5 ml portioniert. Die Aufbewahrung erfolgte in beschrifteten, luftdicht verschlossenen 2-ml-Reaktionsgefäßen und Schraubverschlüssen mit Gummidichtungsring bei -80 °C.

##### 3.3.1.2 Konzept der serologischen Untersuchung und antibiotischen Therapie

Wenn die Untersuchung auf Antikörper gegen infektionsspezifische Lysat-Antigene einen positiven Befund ergab und der C6-Schnelltest positiv ausfiel, wurden die Besitzer durch die Tierärzte benachrichtigt. Es sollte untersucht werden, ob und in welcher Intensität mehrere Monate nach einer antibiotischen Therapie die C6-spezifischen IgG-Antikörperspiegel sinken. Zusätzlich sollte die Entwicklung von eventuellen klinischen Symptomen vor und nach der Therapie beobachtet werden. In Rücksprache mit den Besitzern leiteten die Tierärzte eine Antibiose ein, welche die Besitzer zu Hause durchführen konnten, da die Präparate oral verabreicht wurden. Die Antibiose erfolgte hier zu Studienzwecken unabhängig von dem Vorliegen klinischer Veränderungen. Die Wahl des Präparates wurde den Tierärzten freigestellt, wobei entsprechend der Wirkstoff- Empfehlungen (GREENE et al. 2006) für den Hund aber entweder Doxycyclin (10 mg/kg Körpermasse, 2x täglich oral) oder Amoxicillin (20 mg/kg Körpermasse, 3x täglich oral) verwendet werden sollten. Die Zeiträume der Behandlung sollten für beide Wirkstoffe bei 28 Tagen liegen. Vier bis sechs Monate nach Erstbefund und Beginn der antibiotischen Therapie wurden die Tierbesitzer um eine erneute Blutprobe ihres Hundes gebeten, um den C6-Antikörperspiegel mit den Ergebnissen vor der antibiotischen Therapie vergleichen zu können (Schema siehe Abbildung 7).

Wie sich später im Verlauf der serologischen Untersuchung herausstellte, wiesen nur wenige Hunde infektionsspezifische C6-Antikörper auf und kamen so für eine antibiotische Therapie in Frage. Um aussagekräftigere Daten für den vergleichenden Verlauf von C6-Antikörperreaktionen zu erhalten, sollte eine größere Anzahl seropositiver Hunde untersucht werden. Deshalb wurden nach einer Datenbank-Analyse Tierärzte kontaktiert, die im Rahmen der Borreliose-Routinediagnostik der Arbeitsgruppe Dr. Straubinger in Leipzig bereits kanine Blutproben eingesendet hatten. Hunde, bei denen infektionsspezifische Antikörper gegenüber dem C6-Peptid vorlagen, wurden in die Recherche

einbezogen. Zusätzlich mussten die Hunde auf Grund dieses Befundes antibiotisch mit dem empfohlenen Behandlungsregime behandelt worden sein. So konnte von zwölf weiteren Hunden eine 2. Blutprobe gewonnen werden, um vergleichend 1. und 2. Blutprobe mit den serologischen Testsystemen dieser Studie zu untersuchen. Ebenfalls wurden die Vorberichte analog zu den 510 zuvor untersuchten Hunden erfragt und ausgewertet.

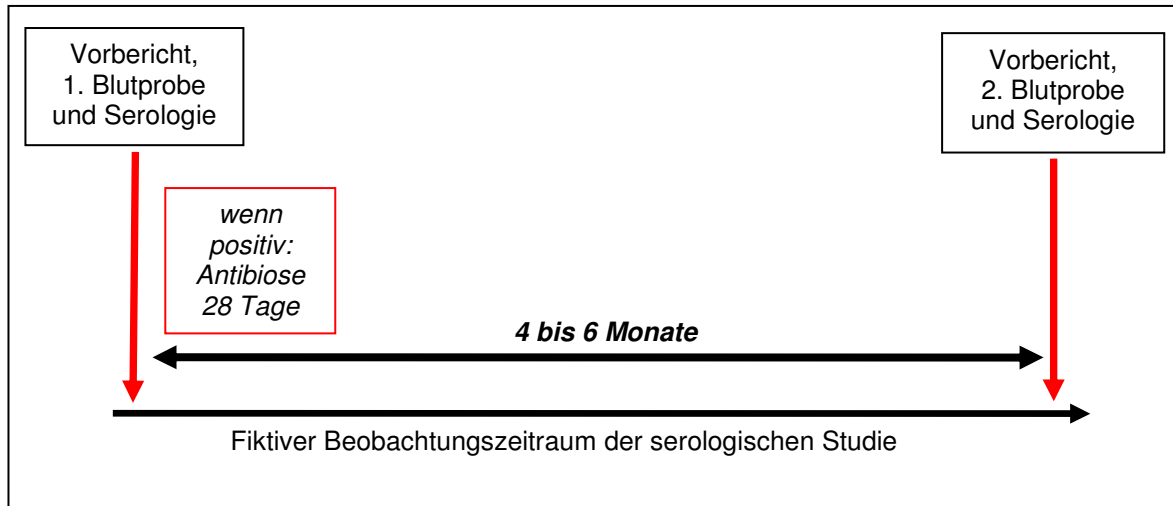


Abbildung 7: Konzept der serologischen Untersuchung und antibiotischen Therapie

### 3.3.1.3 Herstellung von Lysat-Antigen für die serologische Diagnostik

Für den Nachweis von Gesamt-IgG-Serumantikörpern gegen Antigene von lysierten Borrelienzellen (*B. burgdorferi* s.s. N40) mittels KELA und Western-Blot erfolgte zunächst die Herstellung von Lysat-Antigen. Dabei wurde *B. burgdorferi* s.s. Stamm N40 in Passage 3 verwendet.

#### 3.3.1.3.1 Anzucht der Borrelien und Präparation des Antigens

Die Borrelien wurden in Form eines 100- $\mu$ l-Aliquotes in 6 ml BSK-II-Medium überführt und in dieser Vorkultur bis zu einer Konzentration von  $5,5 \times 10^7$  Zellen/ml bei 33 °C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die gesamte Vorkultur in einen Liter BSK-II überführt. Die Kontrolle der Mediumqualität sowie die mikroskopische Beurteilung von Zellwachstum und Vitalität erfolgten an den Tagen 5, 7, 10 und 12. An Tag 12 begann die weitere Verarbeitung zu einem Borrelien-Lysat. Die Arbeitsschritte der Präparation wurden gemäß eines veröffentlichten Protokolls (SHIN et al. 1993) vorgenommen, wobei die Borrelien dabei unter Kühlung auf Eis behandelt wurden. Ein Liter der Borrelienkultur in BSK-II wurde in verschließbaren 80-ml-Zentrifugenröhrchen und (15 min, RT, 10.000  $\times$  g) zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, bis der gesamte Liter Medium abzentrifugiert war. Die Zellpellets wurden in je 40 ml sterilem PBS gelöst und durch mehrfache Zentrifugation (15 min, 4 °C, 10.000  $\times$  g), sowie Verwurf des Überstandes gewaschen. Nach dem Zusammenführen der Zellpellets wurde diese Suspension in einem Endvolumen von 5 ml sterilen PBS in 15-ml-Zentrifugenröhrchen auf Eis aufbewahrt. Mittels Ultraschallbehandlung wurden die Borrelienzellen in Intervallen von 10 bis 15 sec bei 35 W aufgebrochen. Der Zerkleinerungsgrad

wurde nach jedem Intervall im Dunkelfeldmikroskop überprüft. Die Ultraschallbehandlung erfolgte mehrmals, bis in einem mikroskopischen Gesichtsfeld weniger als drei intakte Borrelienzellen nachweisbar waren. Die Suspension wurde auf 1,5-ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 10 min bei  $10.000 \times g$ , 4 °C zentrifugiert. Der Überstand stellte die Antigenfraktion dar.

#### **3.3.1.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Antigenfraktion**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Reagenz folgend der Angaben des Herstellers bei einer Absorptionsmessung von 562 nm bestimmt. Eine Verdünnungsreihe ausgehend von 2,0 mg/ ml (1:1) bovinen Serumalbumins diente als Standard. Entsprechend wurde eine Verdünnungsreihe des Borrelienlysates bis zu einer Verdünnung von 1:128 hergestellt, anhand deren Farbintensität und Absorption der Proteingehalt der Antigenfraktion bestimmt werden konnte.

#### **3.3.1.3.3 Kontrolle der Proteinqualität der Antigenfraktion**

Die Qualität und Struktur der Antigenfraktionen wurde mittels der SDS-PAGE bestimmt. Die Herstellung erfolgte unter Verwendung derselben Reagenzien und Methoden, wie sie später für die Herstellung des Western-Blots Verwendung fanden. Allerdings wurden hier kleinere Gele mit einer Größe von  $10 \times 6$  cm unter Verwendung der Mini PROTEAN II Electrophoresis Cell hergestellt. Die Antigenfraktionen wurden in sterilem PBS um den Faktor 2 von 1:1 bis 1:16 verdünnt. Zum Vergleich wurde eine Antigenfraktion verwendet, die zuvor erfolgreich in der hausinternen Diagnostik mittels Western-Blot verwendet wurde. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinfractionen erfolgte für 60 min bei 180 V. Anschließend wurde die Coomassie-Färbung der Proteinfractionen mittels eines veröffentlichten Protokolls (SAMBROOK et al. 1989) durchgeführt. Im Vergleich zu der Kontrollantigenfraktion wurden anschließend Dicke und Lage der Proteinbanden der Antigenfraktionen auf dem Gel beurteilt. Die weitere Qualitätskontrolle erfolgte mittels eines Western-Blots, um die spezifischen Serumantikörper-Reaktionen gegenüber den verschiedenen Proteinfractionen zu beurteilen. Zunächst wurde eine SDS-PAGE mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Lysat-Antigens durchgeführt (1:1, 1:2, 1:4 in sterilem PBS), anschließend wurde eine Nitrozellulosemembran mit den aufgetrennten Proteinfractionen beschichtet und der Western-Blot wie unter Kapitel 3.3.1.4.2.3 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden definierte kanine Kontrollsera analysiert, die infektions- und impfspezifische Antikörper aufwiesen. Anschließend konnte so die Einsetzbarkeit und die nötige Antigen-Proteinkonzentration für die Verwendung künftiger Western-Blots überprüft werden.

#### **3.3.1.4 Serologische Methoden**

Sowohl mit dem selbst hergestellten Lysat-Antigen in KELA und Western-Blot, als auch mit einem kommerziellen Western-Blot-Testsystem auf der Basis von Lysat-Antigen (*B. afzelii*) + VlsE wurde der Zweistufentest durchgeführt. Die C6-Antikörper wurden erstens mittels eines kommerziell erhältlichen Schnelltests (4Dx<sup>®</sup> SNAP<sup>®</sup>, IDEXX Laboratories), zweitens eines kommerziell

erhältlichen C6-ELISA-Tests (Quant<sup>®</sup> C<sub>6</sub>-ELISA, IDEXX Laboratories) und drittens mit C6-Peptidvarianten in einem ELISA zur Detektion von speziesspezifischen C6-Antikörpern gemessen.

#### **3.3.1.4.1 Kinetischer ELISA (KELA)**

Die Beschichtung der 96-Well-ELISA-Platten erfolgte mit dem zuvor hergestellten Lysatantigen in einer Menge von 2,05 µg pro Kavität (2,05 µg/100 µl). Ein 54-µl-Aliquot des Lysat-Antigens mit einer Proteinkonzentration von 2,6 mg/ml wurde in 200 µl CO<sub>3</sub>/ME/SDS-Lösung sowie 200 µl rekombinanten OspA (Eurican Merilym) gelöst und 1 min bei RT inkubiert. Danach wurden 64 ml 0,1 M Carbonatpuffer hinzugefügt und unter leichtem Rühren für 15 min bei RT gelöst. Anschließend wurde die Hälfte der Kavitäten mit je dieser 100 µl Lysat-Antigen-Lösung befüllt, die restlichen Kavitäten mit je 100 µl 0,1 M Carbonatpuffer ohne Antigenpräparation, welche als Hintergrundkontrollen dienten. Die beschichteten Platten wurden mit Folien verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten bis zur ersten Verwendung für mindestens 24 Stunden bei -29 °C eingefroren.

##### **3.3.1.4.1.1 Durchführung und Auswertung**

Der KELA beruht auf Protokollen der Cornell University, Ithaca, New York, USA und einer Veröffentlichung (TOEPFER et al. 2007). Die ELISA-Platten sowie die zu untersuchenden Hundesera wurden zunächst bei RT aufgetaut. Zusätzlich wurden hier vier Kontrollsera eines experimentell infizierten Hundes, eines Hundes mit mittelgradigem und eines mit niedrigem Infektionsantikörperspiegel und eines serologisch negativen Hundes auf jeder ELISA-Platte mitgeführt. Jede Serumprobe in einem Verhältnis von 1: 100 in PBSTM-Puffer verdünnt. Die aufgetauten ELISA-Platten wurden mit einem automatischen ELISA-Washers viermal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden viermal 100 µl der Serum-PBSTM-Lösung zum Zweck einer Doppelbestimmung (zwei Kavitäten mit Lysat-Antigen und zwei mit Carbonatpuffer als Hintergrundkontrolle beschichtet) aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden die Platten erneut gewaschen. Anschließend wurden 100 µl je Kavität des Detektionsantikörpers Anti-Dog-IgG-HRP in einer Verdünnung von 1:4000 aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT und erneutem Waschen der Platten wurden je Kavität 100 µl des Farbsubstrates TMB hinzugegeben. Dies erfolgte innerhalb einer Minute, nach der sofort das kinetische Messen der Extinktionszunahme im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 650 nm erfolgte. Die Extinktion wurde dreimal alle 45 sec erfasst, um innerhalb einer linearen Funktion die Steigung zu messen. Die erhaltenen Werte in Form der optischen Dichte (OD) wurden anschließend mittels der Computer-Software Microsoft Office Excel 2003 für Windows umgerechnet. Hierzu wurden zur Standardisierung und Vergleichbarkeit Werte in Einheiten (Units) verwendet, welche für die oben genannten vier eingesetzten Kontrollsera in der Cornell University (Ithaca, New York, USA) etabliert wurden und als metrische Variablen dienten. Diese Werte wurden mit den hier erhaltenen Werten für

jede ELISA-Platte korreliert. Es wurde anschließend mit beiden Variablen eine einfache lineare Regressionsanalyse durchgeführt, so dass die Ergebnisse für die untersuchten Proben in Units und dem Standardfehler (SE) gegenüber den Kontrollsera vergleichbar waren. Dabei lag der Cut off (Grenzwert) bei 100 Units. Oberhalb dieses Wertes wurde der KELA als positiv gewertet.

#### **3.3.1.4.2 SDS-PAGE und Western-Blot mit Lysat-Antigen**

Alle Sera, die im KELA positiv reagierten, wurden im Western-Blot untersucht, um zwischen Infektion, Impfung und unspezifischen Antikörperreaktionen zu unterscheiden.

##### **3.3.1.4.2.1 SDS-PAGE**

Mittels der verwendeten Apparatur konnten jeweils zwei Polyacrylamid-Gele von je 14 × 11,5 cm Größe gleichzeitig angefertigt werden. Nach dem Reinigen der Glasplatten mit 70 % Ethanol wurde die Apparatur montiert. Zunächst wurde das Trenngel angefertigt, wobei erst nach einem Entgasen von ca. 5 min APS und TEMED hinzugefügt wurden. Zur gleichmäßigen Polymerisation wurde die noch flüssige Lösung langsam zwischen beide Glasplatten gegossen und sofort mit 0,1 % Overlay-Puffer überschichtet. Nach einer einstündigen Polymerisationszeit wurde das feste Gel mit Waschpuffer gewaschen und mit der Sammelgel-Lösung überschichtet. Unverzüglich wurde ein Kunststoffkamm eingesetzt, welcher Aussparungen für die Geltaschen enthielt. Nach einer Polymerisationszeit von einer Stunde wurden die Kämmen entfernt und die Gele mit Glasplatten in die Elektrophorese-Kammer überführt. Zur Probenaufbereitung wurde ein 54-µl Aliquot des Lysat-Antigens 1:1 mit dem 2X Probenpuffer vermischt und für 2 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte das Aufteilen des abgekühlten Gemisches auf je zwei Geltaschen pro Gel, so dass in jeder der vier Geltaschen 13,5 µl des Lysat-Antigens enthalten waren. Mit einer Spannung von 200 V über einen Zeitraum von 3,5 h wurden die Proteinfraktionen nach ihrer Größe im Gel aufgetrennt.

##### **3.3.1.4.2.2 Transfer des Proteins auf die Nitrozellulosemembran**

Die Trenngele wurden vorsichtig von den Glasplatten gelöst und auf je eine Nitrozellulosemembran (15 × 15 cm) gelegt. Unter der Membran und über dem Gel befand sich je eine Lage aus Cellulose-Filterpapier und einem Schaumstoffnetz, um das exakte Anliegen von Membran und Gel zu ermöglichen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte über Nacht in einer Blotting-Kammer (Tank-Blot-System) mit gekühltem Transferpuffer bei 30 V. Anschließend wurden die beschichteten Membranen je 10 min in Transferpuffer und TBST pH = 10 gewaschen.

##### **3.3.1.4.2.3 Durchführung des Western-Blots**

Die gewaschenen Membranen wurden für mindestens 30 min in 3 % Gelatine bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Antigenbindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in TBST pH = 10 für 5 min und die Fixierung der Nitrozellulosemembran in der Mehrkanal-Western-Blot-Kammer. Die zu untersuchenden kaninen Serumproben wurden 1:10 in 1 %iger Gelatinelösung verdünnt. Danach erfolgte die Befüllung der Kanäle, wobei auch ein

Kontrollserum eines experimentell infizierten und das eines experimentell-geimpften Hundes aufgetragen wurden. Die Membranbereiche der Größenmarker wurden mit 1 % Gelatine befüllt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Der Inkubation (1h, 37 °C) folgte ein Waschschrift mit TBST pH = 10. Folgend wurde die Membran aus der Kammer entfernt und selbst in TBST pH = 10 für 10 min gewaschen. Unter Verwendung des gleichen Detektionsantikörpers wie im KELA in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST pH = 7,5 wurde die gesamte Membran für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde StrepTactin zur Markierung des biotinylierten Proteinmarkers zugefügt. Nach einmaligem Waschen der Membran in TBST pH = 10 und zweimaligem Waschen in TBST pH = 7,5 wurde zu diesem Puffer in kaltem Methanol gelöstes Peroxidase-Substrat (Opti 4-CN) mit Wasserstoffperoxid gegeben und die Membran bis zur gewünschten Farbintensität der Proteinbanden inkubiert. Nach 10 bis 15 min wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen in Aqua dest. abgestoppt, die Membran getrocknet und bis zur Auswertung kühl und dunkel gelagert.

### **3.3.1.4.2.4 Auswertung des Western-Blots**

Anhand der Proteinmarker für das Molekulargewicht erfolgte zunächst eine Einordnung der Proteinbanden entsprechend ihrer Größe. Anschließend wurde durch das Vorhandensein und Kombination spezifischer Banden, welche für eine Infektion oder Impfung sprechen, oder aber auch für unspezifische (negative) Reaktionen ein serologischer Befund in Kombination mit dem KELA-Ergebnis erstellt. Die Auswertung des Western-Blots mit Lysat-Antigen erfolgte gemäß publizierter Erkenntnisse (SHIN et al. 1993; STRAUBINGER et al. 2001; WILSKE 2003; WILSKE et al. 1994) und eigener Erfahrungswerte. Zur Orientierung dienten hier die Serumkontrollen des infizierten und geimpften Hundes. Entsprechend waren Proteinbanden mit Molekulargewichten von 14 (p14), 17 (p17), 21 (p21), 23 (OspC), 31 (p31), 39 (p39), 43 (p43), 58 (p58) und 83/100 (p83/100) kDa als typisch für eine IgG-Serumreaktion bei Vorliegen einer Infektion zu beurteilen, wobei von diesen Banden mindestens zwei gleichzeitig vorliegen mussten. Serumreaktionen gegenüber Proteinen von 31 kDa (OspA) und 34 kDa (OspB) wurden als spezifische Reaktion gegenüber Lysat-Impfstoff aus *B. burgdorferi* s.s. beurteilt. In beiden Fällen musste gleichzeitig ein positives KELA-Ergebnis von über 100 KELA-Units vorliegen. Als unspezifische Serumreaktionen galten Signale gegenüber Proteinbanden von 41 (p41, Flagellin), 60, 66 und 75 kDa, die sowohl bei Infektion als auch Impfung vorkommen können. Ein Beispiel zur Auswertung eines Western-Blots ist in Abbildung 8 dargestellt.



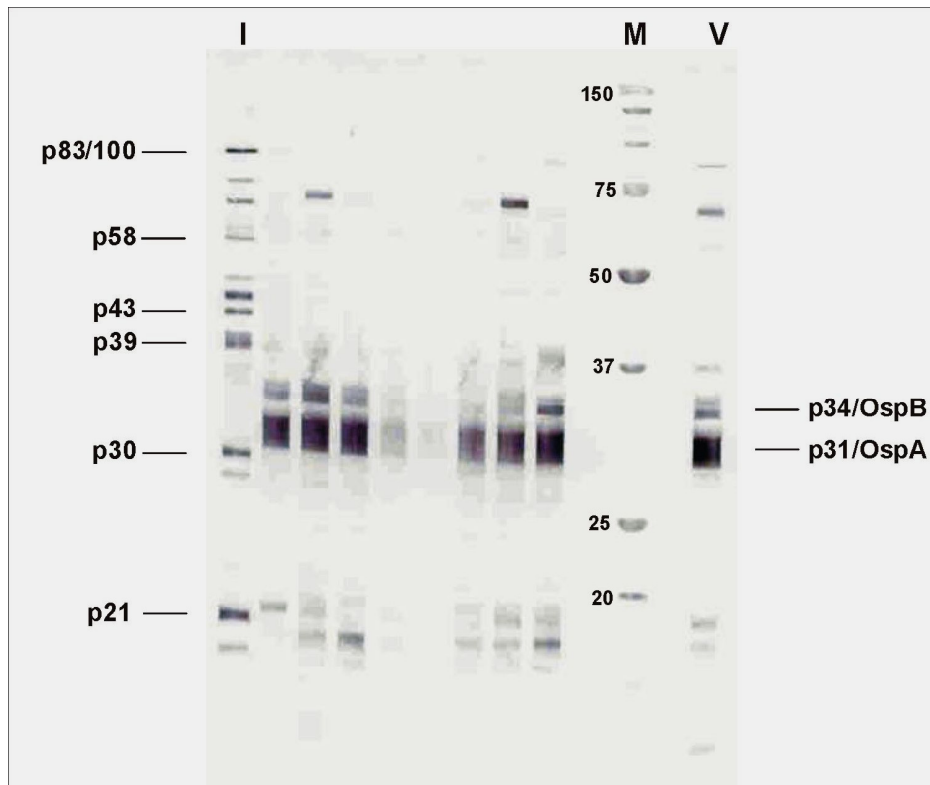


Abbildung 8: Auswertung eines Lysat-Antigen Western-Blots mit Markierung spezifischer Proteinbanden

M : Proteinmarker

V : Serum eines experimentell geimpften Hundes

I : Serum eines experimentell infizierten Hundes

#### 3.3.1.4.3 Kommerzieller Western-Blot mit rekombinantem VlsE

Alle Sera, welche mittels des selbst hergestellten Lysat-Antigens in KELA und Western-Blot positiv getestet wurden, konnten zusätzlich mit einem kommerziell erhältlichen Testsystem auf der Basis von *B.-afzelii* Lysat-Antigen untersucht werden (*Borrelia afzelii* + VlsE Eco Blot IgG Western-Blot, Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim). Hierbei wurden jeweils die Sera untersucht, die vor und nach der antibiotischen Therapie entnommen wurden. Dies bot zusätzlich die Möglichkeit, eine Immunreaktion gegenüber VlsE zu detektieren, welches als rekombinantes Protein auf die antigenbeschichteten Membranen aufgesprüht wurde. Zudem war der wesentlich geringere Zeitaufwand durch Einsparung von Antigenpräparation und SDS-PAGE, sowie die erleichterte Auswertung der Proteinbanden, chargenspezifischen Serumkontrollen und Reagenzien eine wesentlicher Faktor zur Sicherung gleich bleibender Qualität, Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde bereits für die hauseigene serologische Diagnostik ein Protokoll erarbeitet, welches dieses für den humanmedizinischen Gebrauch zugelassene Testsystem

an die Untersuchung kaniner Proben adaptiert. Entsprechend konnten nun zwei Lysat-Antigen-basierte Western-Blots verwendet werden, deren Ergebnisse bei Bedarf verglichen werden konnten.

#### **3.3.1.4.3.1 Durchführung des Western-Blots**

Die Durchführung des Western-Blots entsprach den Vorgaben des Herstellers mit folgenden Änderungen. Die kaninen Sera jedes seropositiven Hundes wurden jeweils vor und nach der antibiotischen Therapie vergleichend als Serumpaar untersucht. Nach einer Verdünnung von 1:100 und Inkubation von 30 min mit je einem Membran-Teststreifen wurden Serumreste durch Waschen von der Membran entfernt. Anschließend wurde ein Anti-Dog-IgG-AP-Detektionsantikörper in einer Verdünnung von 1:4000 für 35 min mit den Teststreifen inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Farbentwicklung unter Zugabe von Substratlösung für eine Dauer von 16 bis 20 min. Anschließend wurde die Farbreaktion mit Aqua dest. abgestoppt und die Streifen bis zur Auswertung luftgetrocknet.

#### **3.3.1.4.3.2 Auswertung des Western-Blots**

Die Auswertung erfolgte weitgehend entsprechend der Kriterien, welche bereits unter 3.3.1.4.2.4 beschrieben wurden. Da hier ein *B.-afzelii*-basiertes Lysat-Antigen sowie VlsE zur Verwendung kamen, wurden gemäß der Empfehlungen für IgG-spezifische Proteinbanden mindestens das Vorhandensein von VlsE und zwei der folgender Proteinbanden als seropositiv für eine Infektion gewertet: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, p17 und p14. Da es hier keine impfspezifischen Auswertungshinweise vorgesehen waren, wurden die auch auf der Auswertungsschablone markierten Banden für OspA (p31) sowie OspB (p34) entsprechend einbezogen. Ein Beispiel für die Auswertung zeigt Abbildung 9.

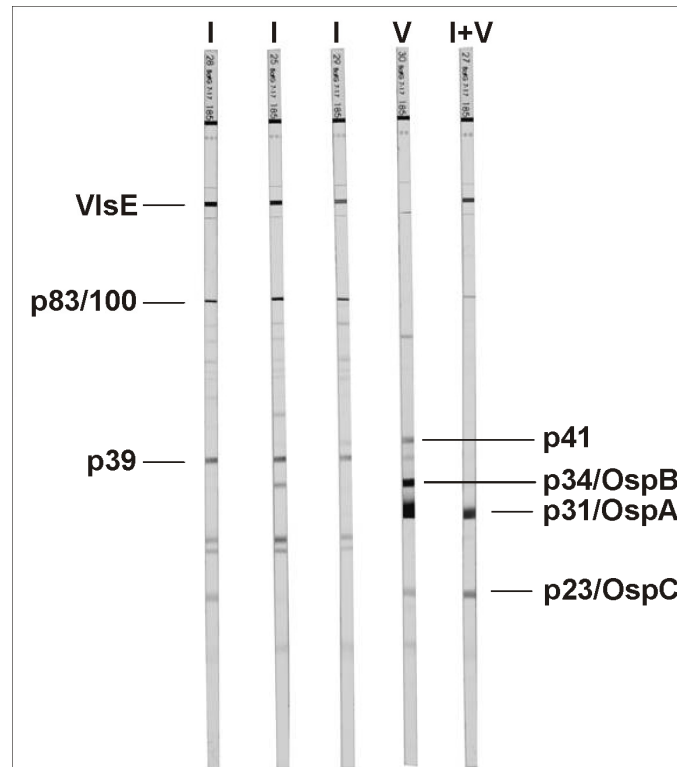


Abbildung 9: Auswertung eines Western-Blots mit Lysat-Antigen und rekombinantem VlsE (*B. afzelii*+VlsE Eco Blot, Genzyme Virotech)

V : Serum eines experimentell geimpften Hundes

I : Serum eines experimentell infizierten Hundes

I+V : Serum eines geimpften und infizierten Hundes

#### 3.3.1.4.4 C6-Schnelltest

Der hier als „C6-Schnelltest“ benannte SNAP<sup>®</sup> 4Dx<sup>®</sup> (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) basiert auf dem Prinzip des ELISA. Dieses System wurde für den Gebrauch in Tierarztpraxen entwickelt. Eine Testeinheit besteht aus einer Membranmatrix, auf die punktförmig hochspezifische Peptidantigene von Borrelien (C6-Peptid), aber auch von *Ehrlichia canis* und Antikörper gegen *Dirofilaria immitis* aufgebracht sind. In der neuen Testausführung ist auch Peptid-Antigen von *A. phagocytophilum* enthalten. Zudem enthält das Testfeld eine Kontrolle für die Funktionstüchtigkeit des Tests, die sich intensiv blau färben muss. Folgend der Testanleitung wurden mittels einer Dosierpipette drei Tropfen Serum (die Verwendung von Vollblut ist ebenfalls möglich) in ein 2-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit vier Tropfen einer Konjugatlösung vermischt. Anschließend wurde mit einer Pipette die gesamte Lösung auf ein vorgesehenes Reaktionsfeld der Membran gebracht. Die Lösung fließt über die Antigen- beziehungsweise Antikörper-beschichteten Bereiche der Membranmatrix. Im positiven Fall binden die bereits Konjugat-markierten Antikörper (bzw.

Dirofilarien-Antigene) aus dem Hundeserum spezifisch an diese Membranbereiche. Der Test wurde manuell durch das Eindrücken eines Kunststoff-Feldes aktiviert, was ein Zweikammersystem öffnet. Zunächst entfernt eine Waschlösung durch Fließen in die entgegengesetzte Richtung nicht gebundene, unspezifische, konjugatmarkierte Antikörper und Serumbestandteile. Ihr folgt eine Substratlösung, welche mit dem eventuell auf der Membran gebundenen Enzymkonjugat zu einem blauen Farbkomplex reagiert. Im Falle eines solchen positiven Ergebnisses kann dieses nach acht min visuell als blauer Punkt in dem erregerspezifischen Feld abgelesen werden. Die Auswertung der Farbreaktion wurde abweichend von den Herstellerangaben modifiziert und in Intensitäten eingeteilt, um eine semiquantitative Auswertung zu ermöglichen. Das Serum aller Hunde wurde speziell auf das Vorhandensein von Serumreaktionen gegenüber dem C6-Peptid getestet, was im Falle einer seropositiven Reaktion auch nach Abschluss der antibiotischen Therapie erneut erfolgte.

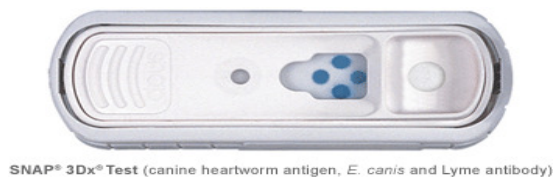


Abbildung 10: „C6-Schnelltest“  
(SNAP® 3Dx® IDEXX Laboratories  
Inc., Westbrook, Maine, USA)

### 3.3.1.4.5 Kommerzieller C6-ELISA-Test

Das C6-ELISA-Testsystem (Quant C<sub>6</sub>®-ELISA, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) steht für den laborinternen Gebrauch als ein „Testkit“ zur Verfügung. Die Auswertung des ELISAs sollte entsprechend der Herstellerangaben mittels eines Computersystems erfolgen, welcher die OD-Werte in Einheiten (Units) umrechnet. Laut der Interpretationsempfehlung (ANON.VET MED LABOR 2008) sollte sich dieser C6-ELISA einem positiven C6-Schnelltest anschließen, um die C6-Antikörperreaktion zu quantifizieren. Hierbei werden mittels des laborinternen Auswertungssystems C6-Antikörperspiegel über 30 Units als hoch bewertet und unter 30 Units als niedrig. Im Falle eines hohen Antikörperspiegels über 30 Units soll eine Behandlung der Hunde erwägt werden und eine anschließende Therapiekontrolle durch den C6-ELISA nach drei bis sechs Monaten erfolgen. Als erfolgreiche Therapie wird eine Reduktion des C6-Antikörperspiegels um 50 % bezeichnet. Im Falle eines initial niedrigen C6-Antikörperspiegels unter 30 Units wird dagegen keine Behandlung, sondern der Ausschluss von Differenzialdiagnosen und ein eventuelles Nachtesten nach drei bis sechs Wochen empfohlen. Ausdrücklich wird das gesamte Diagnostikprinzip nicht für Hunde empfohlen, die in den vorangegangenen Monaten vor der Diagnostik mit Antibiotika behandelt wurden. Hier wird die Diagnostik mit dem Zweistufentest nahegelegt. Dagegen sollte eine Antibiose wenige Wochen vor der Therapie den Test nicht beeinflussen. Die Hunde der serologischen Studie, welche in KELA, Western-Blot und C6-Schnelltest seropositiv reagierten, wurden mittels des C6-ELISA in dieser Arbeit untersucht. Dies erfolgte zunächst entsprechend des dort zur Verfügung stehenden Systems zur Auswertung in Units bei der Vet Med Labor GmbH in Ludwigsburg, Deutschland. Zu diesem Zeitpunkt lagen nur teilweise die Blutproben von Hunden vor und nach der

antibiotischen Therapie vor. Aus Datenschutzgründen konnte zudem die Umrechnungsgrundlage von ODs in Units nicht zur Verfügung gestellt werden, so dass die entsprechende wissenschaftliche Grundlage nicht bekannt war. Aus diesem Grund wurde der ELISA folgend im Institut für Immunologie in Leipzig durchgeführt, wo mit den OD-Werten vor und nach der antibiotischen Therapie deren Quantität ebenso detailliert erfasst werden konnte.

#### 3.3.1.4.5.1 Durchführung und Auswertung

Der Test wurde mit den bereitgestellten Reagenzien entsprechend der Testanleitung des Herstellers durchgeführt, wobei die Serumproben der Hunde in Verdünnungen von 1:500, 1:1000 und 1:2000 untersucht wurden. In die Auswertung einbezogen wurden die Werte, die mit Serumverdünnungen von 1:1000 erhoben wurden. Die Auswertung erfolgte entsprechend der oben genannten OD-Werte. Durch ebenfalls untersuchte negative Kontrollsera wurden für jede ELISA-Platte unspezifische Hintergrund-Reaktionen von den OD-Werten subtrahiert und sowohl Mittelwert, als auch die Standardabweichung der vierfachbestimmten Werte für jede Serumprobe ermittelt. Zur Orientierung dienten sowohl die fünf vom Hersteller beigelegten Positiv- und Negativkalibratoren, als auch wie für KELA und Western-Blot ein hausinternes Serum eines experimentell infizierten Hundes.

#### 3.3.1.4.6 C6-ELISA mit speziesspezifischen C6-Peptiden

Die Herstellung und Beschichtung von ELISA-Platten, welche jeweils das C6-Peptid von *B. burgdorferi* s.s. (BbC6), *B. garinii* (BgC6) oder zwei Peptidvarianten von *B. afzelii* (BaC6-1 und BaC6-2) trugen, wurde in der Forschungsabteilung der Firma IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA vorgenommen; dabei betrug die Proteinkonzentration 0,5 µg/ml. Die C6-Peptide waren 26 Aminosäuren lang, da sie N-terminal an Cystein konjugiert wurden. Die Aminosäuresequenzen, sowie die Referenznummer für die veröffentlichten Sequenzen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die ELISA-Platten wurden gegen Austrocknung luftdicht mit Folie verschlossen und bei +4 °C gekühlt zum Institut für Immunologie nach Leipzig versendet, wo die Durchführung des ELISA erfolgte. Bis zur Verwendung der ELISA-Platten wurden diese bei +4 °C gelagert, die maximale Lagerungsdauer betrug acht Wochen bis zur Verwendung.

Tabelle 4: Aminosäuresequenzen der verschiedenen C6-Peptide

Spezies/ Rekombinations- kassette	Peptid	Aminosäuresequenz mit N-terminal konjugiertem Cystein (C)	Referenz (Accession No.)
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto B31 Vls15	BbC6	CMKKDDQIAAAIALRGMADGKFAVK	AAC45189.1
<i>B. garinii</i> IP 90 Vls7	BgC6	CMKKDDQIAAAMVLRGMADGQFALK	AAN87831.1
<i>B. afzelii</i> ACAI Vls1	BaC6-1	CMKKSDKIAAAIVLRGVAKSGKFAVA	AAN87809.1
<i>B. afzelii</i> ACAI Vls3	BaC6-2	CMKKRNDKIVAAIVLRGVAKDGKFAAA	AAN87811.1

#### **3.3.1.4.6.1 Durchführung und Auswertung**

Das Protokoll zur Durchführung des ELISAs wurde in Anlehnung an das Protokoll des kommerziellen Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-ELISA entwickelt. Entsprechend handelte es sich auch hier im Gegensatz zum KELA um einen Endpunkt-ELISA. Zudem wurden Reagenzien wie Serumverdünnungspuffer und Detektionsantikörper aus den Komponenten des Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-Kits verwendet. Das Substratreagenz TMB sowie die Stopplösung wurden separat zu den ELISA-Platten bereitgestellt und wie oben bei +4 °C gelagert. Es wurden auf Grund eingeschränkter Anzahl zu Verfügung stehender ELISA-Platten nur die Serumproben der Hunde vor der antibiotischen Therapie untersucht. Hier wurden die Sera sowohl in Verdünnungen von 1:500 als auch 1:1000 überprüft. Nach Vorversuchen bezüglich der Sensitivität wurde eine Verdünnung von 1:1000 verwendet. Die Sera wurden nach dem dreimaligen Waschen der ELISA-Platten im ELISA-Washer mit PBST in Volumina von 100 µl pro Vertiefung pipettiert, wobei auch hier eine Vierfachbestimmung erfolgte. Ebenfalls wurden ein positives und ein negatives Kontrollserum und die fünf Kalibratorseren des kommerziellen Kits mitgeführt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 25 °C wurden die ELISA-Platten erneut gewaschen und für weitere 30 min bei 25 °C mit dem Detektionsantikörper des kommerziellen C6-ELISA inkubiert. Hier wurden ebenfalls 100 µl je Kavität verwendet. Nach einem Waschschrift wurden schließlich 100 µl pro Kavität TMB-Substratlösung auf die ELISA-Platten gebracht und genau 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Farbreaktion mittels der Stopplösung des Herstellers durch Zugaben von 50 µl pro Kavität abgestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 650 nm mit dem Spektrophotometer. Die Auswertung der erhaltenen OD-Werte erfolgte entsprechend wie unter Kapitel 3.3.1.4.5.1 beschrieben.

### 3.3.2 Methoden des Infektionsversuchs

#### 3.3.2.1 Anzucht der Borrelien

Die für die In-vitro- und In-vivo-Studien verwendeten Borrelienspezies in ihrer Originalpassage sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Borrelien

Name der Borrelienspezies	Stamm	Passage	Abkürzung
<i>B. burgdorferi</i> s.s. N40	N40	3	<i>Bb</i>
<i>B. garinii</i> PBi	PBi	17	<i>Bg</i>
<i>B. afzelii</i> PKo	PKo	32	<i>Ba</i> PKo
<i>B. afzelii</i> (Isolat Slowakei)	unbekannt	2	<i>Ba</i> Slowakei
<i>B. valaisiana</i>	VS116	46	<i>Bval</i> VS116
<i>B. valaisiana</i>	Rio 6	2	<i>Bval</i> Rio6
<i>B. spielmanii</i>	A14 S	9	<i>Bspi</i>
<i>B. lusitaniae</i>	unbekannt	14	<i>Blus</i>

*B. burgdorferi* s.s. N40: Bei *B. burgdorferi* s.s. N40 handelt es sich um ein Isolat aus einem experimentell durch Zecken infizierten Hund (Cornell University, Ithaca, N.Y., USA). Der Stamm N40 zeigte sich im murinen Infektionsmodell als infektiös (KNAUER 2006) und wird ebenfalls in Passage 3 als Bakterienlysate-Antigen im bereits vorgestellten ELISA-Testsystem und im Western-Blot genutzt.

*B. garinii* PBi und *B. afzelii* PKo: Beide Stämme werden als Referenzstämme für die Borreliose-Diagnostik des Menschen in Europa verwendet und empfohlen (HAUSER et al. 1997). Sie wurden von Frau Dr. Bettina Wilske (Max von Pettenkofer-Institut, München) zur Verfügung gestellt.

*B. afzelii*, unbekannter Stamm: Hierbei handelt es sich um ein Isolat aus einer Zecke. Das Isolat wurde von Frau Maria Kázimirova (Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia) zur Verfügung gestellt. Es wird in der vorliegenden Arbeit als „*B. afzelii* Slowakei“ bezeichnet. Die Originalpassage ist unbekannt. Die Speziesidentität wurde als Fremdleistung durch eine Sequenzierung des *ospA* Gens mit einer 600 bp amplifizierenden 16S-DNA-PCR (RICHTER et al. 2003) von Frau Dr. Dania Richter, Institut für Pathologie, Sektion Parasitologie, Charité Berlin bestätigt (persönliche Mitteilung).

*B. valaisiana* VS 116: Dieser Borrelienstamm war Teil des institutsinternen Borrelienbestandes. Die Herkunft ist unbekannt.

*B. valaisiana* Rio 6: Diese Bakterien wurden von Frau Raquel Escudero, Centro Nacional de Bacteriología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spanien zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein Zeckenisolat aus Spanien.

*B. spielmanii* A14 S: Das verwendete Isolat des Stammes A14 S in Passage 9 wurde durch Herrn Dr. Christian Epe aus dem Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

*B. lusitaniae*: Die Spirochäten in Passage 14 stammen als Erstisolat aus der Hautveränderung einer portugiesischen Patientin, welches für diese Studien von Frau Margarida Collares-Pereira, Institute for Hygiene and Tropical Medicine, Lissabon, Portugal zur Verfügung gestellt wurde.

Die genannten Borrelienspezies und -stämme wurden im Brutschrank bei 33 °C in 6-ml-Aliquoten des vorgesehenen Mediums (12-ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss, TPP®, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. Als Kulturmedien dienten BSK-II, MPK und modifiziertes BSK-H, wobei zunächst die Gehalte an Kaninchenserum und Gelatine für das modifizierte BSK-H als wesentliche, limitierende Faktoren für ein optimales Wachstum variiert wurden. Auf Grund von Erfahrungswerten wurde *B. burgdorferi* s.s. N40 und *B. garinii* PBi in BSK-II-Medium kultiviert. Für alle anderen Borrelienspezies und -stämme wurden die Kulturmedien optimiert. Hierbei wurden BSK-II- und BSK-H-Varianten mit 7,0 %, 8,0 %, 10,0 %, 12,0 % und 14,0 % Kaninchenserum hergestellt und die Borrelien darin kultiviert. Die Kulturen wurden an den Tagen 5, 7, 10, 14 und 21 im Dunkelfeldmikroskop bezüglich Vitalität (Beweglichkeit/Fortbewegung, Teilungsaktivität und Spiralisierungsgrad einzelner Zellen) visuell beurteilt sowie mittels einer Petroff-Hausser-Zählkammer (Hausser Scientific, USA) hinsichtlich ihrer Zellzahl pro ml in 400facher Vergrößerung gezählt. Für die Infektionsversuche wurden Borrelien im jeweils besten Medium bis einer optimalen Vitalität und Teilungsphase bzw. der jeweiligen log-Phase kultiviert. Dies wurde durch tägliche visuelle Beurteilung und Zählen der Bakterienzellen gewährleistet.

### **3.3.2.2 Infektionsmodell**

Das Infektionsmodell beruht auf Methoden, die zum Teil in einer Dissertation veröffentlicht sind (KNAUER 2006). Die immunkompetente Maus des Stammes C3H/HeN wurde als Tiermodell für die Untersuchung der Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. etabliert. Zunächst sollte in dieser Arbeit eine Aussage über die potenzielle Infektiosität der Borrelienspezies im murinen Tierversuchsmodell erreicht werden. Dazu erfolgten serologische Untersuchungen bezüglich einer Immunantwort des Wirtes, die Re-Isolierung der Bakterien aus verschiedenen murinen Geweben durch Kultivierung in Nährmedium, den Nachweis von Plasmid-DNA in den Borrelien selbst, sowie auch durch den Nachweis von Borrelien-DNA aus murinen Geweben. Des Weiteren sollte in diesem Tierversuchsmodell der serologische Nachweis von Antikörpern gegen in Europa vorkommende Borrelienspezies erfolgen, um die potenzielle Sensitivität des C6-Testsystems zu untersuchen. Hier wurde ebenfalls vergleichend die Immunantwort gegen Lysat-Antigene im Zweistufentest untersucht. Der Aufbau des Infektionsmodells ist in Abbildung 11 dargestellt. Es basierte nach der Borrelieninokulation (Tabelle 6) auf einer zweimaligen Blutentnahme an den Tagen 28 und 56 p.i. sowie einer Blutentnahme im Rahmen der Tötung der Mäuse an Tag 60 bis 63 p.i. und der Gewebe-



Entnahmen zur Kultivierung und PCR. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, um sowohl Schwankungen bei Methodik, als auch bei Faktoren wie Borrelienwachstum, Tiersterblichkeit, Qualität des Mediums und der Testsysteme auszugleichen. Hierbei wurden einige Borrelienspezies mehrfach, einige nur einmal in Mäuse inokuliert. Zusätzlich wurde in einem Versuchsansatz eine Blutentnahme an Tag 84 p.i. sowie die Tötung der Mäuse an Tag 90 p.i. vorgenommen, um bei Bedarf den Verlauf der Immunantwort gegen einige Borrelienarten länger zu kontrollieren.

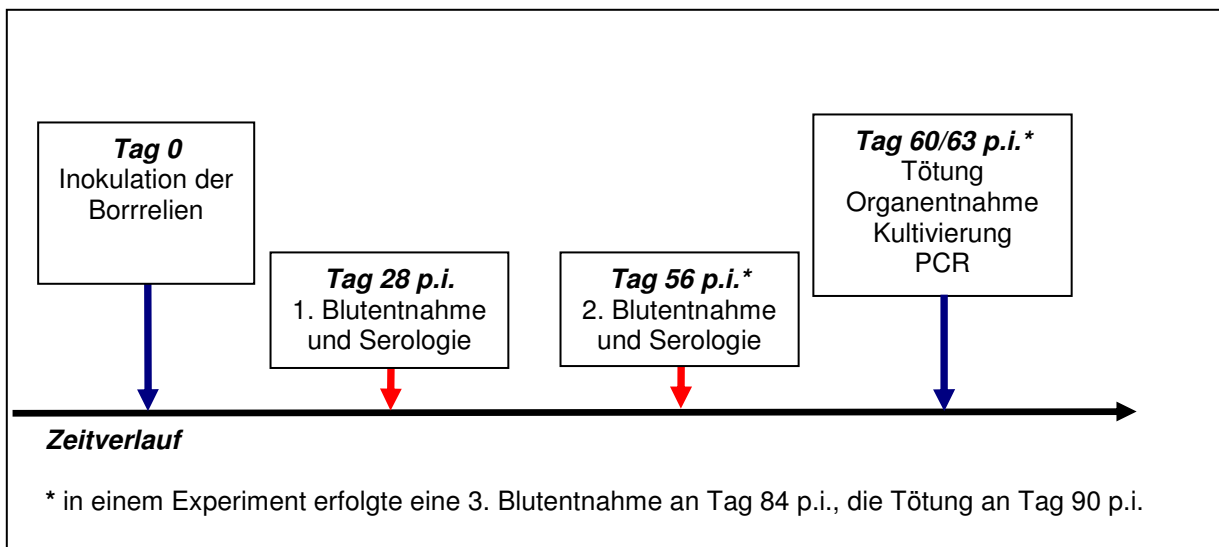


Abbildung 11: Aufbau des Tierversuchs im murinen Infektionsmodell

### 3.3.2.2.1 Anästhesie der Mäuse

Sowohl für die Inokulation der Borrelien, als auch für die Blutentnahmen wurden die Mäuse anästhesiert. Dies erfolgte mit einer Ketamin/Xylazin-Mischung (1:1). Die Lösung wurde zuvor 1:10 in 0,9 % physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Das intraperitoneale Injektionsvolumen je Gramm Körpermasse betrug 10 µl. Die Mäuse wurden entsprechend vorher gewogen und ihr Körpergewicht dokumentiert. Die Narkosedauer betrug zwischen 15 und 30 min. Um einer Hypothermie vorzubeugen, wurden die Mäuse unter einer Infrarot-Wärmelampe bis zum Erwachen beobachtet.

### 3.3.2.2.2 Intradermale Inokulation der Borrelien

Nachdem die Mäuse keine Reaktion auf taktile oder akustische Reize mehr zeigten, wurde mittels Einweg-Rasierklingen ein ca. 1,5 cm<sup>2</sup> großer Bereich des Rückens rasiert. Anschließend erfolgte die intradermale Inokulation der Borrelien in diesen Hautbereich. Die Injektionsdosis der Borrelien je Maus lag zwischen  $6,0 \times 10^5$  und  $10^6$ . Diese unterschiedlichen Dosierungen ergaben sich aus der unterschiedlichen Teilungsaktivität der Bakterien bei Erreichen der log-Phase. Um eine ausreichende Konzentrierung der Borrelien zu erreichen, wurden die Borrelien teilweise bei  $10.000 \times g$  für 10 min

bei RT zentrifugiert und das entstandene Pellet in dem zu injizierenden Volumen Nährmedium gelöst. Die Borrelien wurden in einem Volumen von maximal 200 µl je Maus injiziert, wobei dieses Volumen in mehrere intrakutane Depots von maximal 50 µl aufgeteilt wurde.

#### **3.3.2.2.3 Blutentnahme und Serumgewinnung**

Die Blutentnahme zur Gewinnung von Serum erfolgte intra vitam über den retrobulbären Zugang, wozu die Tiere erneut anästhesiert wurden. Mittels einer Hämatokrit-Kapillare wurden jeder Maus maximal 200 µl Vollblut entnommen und in einen Serumseparator überführt. Am Tage der Tötung der Mäuse erfolgte die Blutentnahme intrakardial, nachdem diese durch CO<sub>2</sub>-Inhalation betäubt wurden. Anschließend wurde der Brustkorb der Tiere unter sterilen Bedingungen geöffnet. Durch die Entnahme von ca. 800 µl Vollblut aus den Herzkammern mittels einer 1-ml-Tuberkulinspritze wurde gleichzeitig die Tötung durch Blutentzug vollzogen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei RT wurde das koagulierte Blut bei 9000 × g für 5 min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zu weiteren Analysen bei -80 °C aufbewahrt.

#### **3.3.2.2.4 Gewebeentnahme**

Die Entnahme von Organgeweben erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach der Blutentnahme wurden der Maus zunächst das Herz und nach Eröffnung der Bauchhöhle die Blase entnommen. Anschließend wurde das rechte Tarsalgelenk, welches von Haut befreit und eröffnet wurde, entfernt. Dann wurde ein Stück Haut des linken Ohres entnommen sowie ein Stück des Rückenhautareals, in welches die Borrelien zu Versuchsbeginn inokuliert worden waren. Von allen Mäusen der Experimente II und III wurden Gewebeteile von Herz, Ohr und Rückenhaut bei -80 °C eingefroren, um eine spätere Untersuchung mittels PCR zu ermöglichen.

#### **3.3.2.2.5 Kultivierung zur Anzucht und Isolierung von Borrelien**

Nach dem Waschen in 70 %igem Ethanol und sterilem PBS wurde jedes Gewebe mittels einer Skalpellklinge zerkleinert. Danach wurde es in 150 µl eines Kulturmediums überführt. Das Medium entsprach demjenigen, welches zuvor zur Kultivierung der in die Maus inokulierten Borrelienspezies verwendet wurde. In diesem Medium wurde das Gewebe mit einem Kunststoffstößel zerquetscht, um die Oberfläche zur Dissemination eventueller Spirochäten aus dem Gewebe in das Kulturmedium zu vergrößern. Die Gewebestücke wurden mit dem Medium in je 6 ml frisches Medium überführt und wie zuvor die Borrelien bei 33 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von acht bis zehn Wochen. Wöchentlich wurde eine Kontrolle mittels des Dunkelfeldmikroskopes auf das Vorhandensein vitaler Borrelien vorgenommen. Sofern diese vorhanden waren, wurden die Spirochäten für eine spätere DNA-Extraktion für die PCR zu einem Pellet abzentrifugiert (10.000 × g, 15 min, RT) mehrmals in PBS gewaschen und bei -80 °C eingefroren. Ebenfalls wurden die Borrelien bis zur log-Phase kultiviert und als neue Passage 0 bei -80 °C mit 15 % Glycerol eingefroren.

Tabelle 6: Überblick über die durchgeführten Inokulationen von Borrelien in Mäuse

Borrelien	Kultur- medium	Experiment I ) <sup>a</sup>		Experiment II) <sup>b</sup>		Experiment III) <sup>a</sup>		Summe
		Dosis /Maus	Anzahl der Mäuse	Dosis / Maus	Anzahl der Mäuse	Dosis / Maus	Anzahl der Mäuse	
<i>Bbss</i> N40	BSK II	10 <sup>6</sup>	6	10 <sup>6</sup>	10	10 <sup>6</sup>	5	21
<i>Bg</i> PBi	BSK II	10 <sup>6</sup>	6	10 <sup>6</sup>	10	6,0 × 10 <sup>5</sup>	5	21
<i>Ba</i> PKo	MKP	10 <sup>6</sup>	6	) <sup>c</sup>	0	10 <sup>6</sup>	17	23
<i>Ba</i> Slov	BSK II	10 <sup>6</sup>	6	) <sup>c</sup>	0	7,6 × 10 <sup>5</sup>	15	21
<i>Bv</i> VS116	BSK II	10 <sup>6</sup>	6	) <sup>c</sup>	0	) <sup>c</sup>	0	6
<i>Bv</i> Rio 6	BSK II	) <sup>c</sup>	0	10 <sup>6</sup>	8	) <sup>c</sup>	0	8
<i>Bspi</i> A14S	BSK II	10 <sup>6</sup>	12	) <sup>c</sup>	0	10 <sup>6</sup>	6	18
<i>Blus</i>	BSK II	10 <sup>6</sup>	6	10 <sup>6</sup>	8	10 <sup>6</sup>	10	24
Summe der Mäuse (inokuliert)			48		36		58	142
Negativ- Kontrollen			0		2		5	7

)<sup>a</sup> Blutentnahme an den Tagen 28, 56 und 63 p.i., Tötung der Mäuse an Tag 60/63)<sup>b</sup> Blutentnahme an den Tagen 28, 56 und 84 p.i., Tötung der Mäuse an Tag 90)<sup>c</sup> Keine Inokulation dieser Borrelien

### **3.3.2.3 Serologische Methoden**

Die IgG-Antikörperreaktionen gegen die inokulierten Borrelien als ein Hinweis auf eine erfolgreiche Infektion mit den jeweiligen Bakterienspezies wurden mittels des bereits beschriebenen KELAs, des kommerziellen Western-Blots mit Lysat-Antigen und den verschiedenen C6-Peptid-ELISAs untersucht. Folgend werden nur die Änderungen in den Materialien und Methoden beschrieben, welche zur Adaptation an das murine Modell notwendig waren. Die murinen Sera wurden zu den Untersuchungen aufgetaut, aber auf Eis gekühlt. Mittels der Untersuchung 27 aufbewahrter Sera von nicht-infizierten C3H/HeN-Mäusen konnte sowohl für den KELA, als auch für die C6-Peptid-ELISA ein Schwellenwert (Cut-off) berechnet werden, welcher sich aus dem Mittelwert für die 27 Sera + 5 Standardabweichungen errechnete.

#### **3.3.2.3.1 KELA**

Die murinen Sera wurden 1:100 in PBSTM verdünnt. Der verwendete Detektionsantikörper (Goat-Anti-Mouse IgG-HRP) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Auf jeder ELISA-Platte wurde als Positiv-Kontrolle das Serum einer Maus, die experimentell mit *B. burgdorferi* s.s. infiziert wurde, sowie als Negativkontrolle das Serum einer nicht infizierten Maus mitgeführt. Mittelwert und Standardfehler wurden wie bereits beschrieben berechnet. Die Sera von Tag 28 und 56 p.i. wurden untersucht, um Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Immunreaktion zu erhalten. Ebenfalls wurden die vorhandenen Sera aus Experiment II von Tag 84 p.i. untersucht, sofern bis zum Tag 56 p.i. keine deutlichen Immunreaktionen zu erkennen waren. Allerdings ergaben diese Daten keinen Hinweis auf positive Antikörper-Reaktionen, so dass sie im weiteren Verlauf der Arbeit nicht gezeigt werden.

#### **3.3.2.3.2 Kommerzieller Western-Blot mit rekombinantem VlsE**

Sowohl die Durchführung, als auch die Auswertung erfolgte nach Kriterien wie in Kapitel 3.3.1.4.3 beschrieben. Als Detektionsantikörper diente allerdings Goat-Anti-Mouse IgG-AP, welcher in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt wurde. Es wurde Serum von Tag 56 p.i. untersucht, um eine deutlich ausgeprägte Immunreaktion zu erhalten.

#### **3.3.2.3.3 Kommerzieller C6-ELISA Test**

Da der kommerzielle C6-ELISA (Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>) zur Untersuchung kaniner Serumproben entwickelt wurde, war auch hier eine Adaptation an das murine Modell notwendig. Bis auf Konjugat-Detektionsantikörper und den fünf Serumkontrollen wurden alle Reagenzien des Testkits verwendet. Die Serumproben wurden 1:100 verdünnt. Als Detektionsantikörper kam derselbe wie bereits für den KELA verwendet zum Einsatz. Auf Grund des Mangels an Erfahrungswerten wurde jedes Serum zunächst mit zwei Verdünnungsstufen des Detektionsantikörpers (1:1000 und 1:500) untersucht und folgend die Verdünnung 1:1000 verwendet. Zudem wurden auch hier Sera der Zeitpunkte 28 Tage p.i. und 56 Tage p.i. untersucht, um einen quantitativen, zeitlichen Verlauf der C6-

Immunreaktionen zu messen. Die Sera von Tag 84 (Experiment II) wurden ebenfalls getestet, allerdings zeigten sich ebenso wie bei den Ergebnissen des KELA keine deutlichen Unterschiede gegenüber Tag 56 p.i. Es wurde eine Positivkontrolle einer infizierten Maus und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten wie unter 3.3.1.4.5.1 beschrieben.

#### **3.3.2.3.4 C6-ELISA mit speziesspezifischen C6-Peptiden**

Das Protokoll für Durchführung und Analyse, welches in den Kapiteln 3.3.1.4.5.1 und 3.3.1.4.6.1 für Hunde beschrieben wurde, kam hier ebenfalls zur Verwendung. Positivkontrollen und Negativkontrollen stellten entsprechende murine Sera dar. Auf Grund der limitierten Zahl zur Verfügung stehender ELISA-Platten wurden nur die Sera von Tag 56 p.i. untersucht. Die Verdünnung des Detektionsantikörpers betrug 1:500, die der Serumproben 1:100.

#### **3.3.2.4 Molekularbiologische Methoden**

Um einer Aussage über die Infektiösität der verwendeten Borrelienspezies zu erhalten, wurde die DNA der Borrelienspezies- und -stämme, sowie die von re-isolierten Borrelien gewonnene DNA mittels einer PCR auf das Vorhandensein von lp25 und lp28-1 untersucht. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob unabhängig von einer erfolgreichen Re-Isolierung die DNA der Borrelien in den Geweben Rückenhaut als Ort der Injektion und einem entfernten Körpergewebe wie dem Ohr nachgewiesen werden kann. Der Nachweis erfolgte mittels einer quantitativen real-time PCR, die das *ospA*-Gen der Borrelien nachweist.

##### **3.3.2.4.1 DNA-Extraktion mittels eines kommerziellen Extraktionskits**

Für die hier beschriebene Extraktion von DNA aus Borrelien und murinen Geweben wurde ein kommerzieller Kit verwendet (Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit). Das Protokoll wurde den Angaben des Herstellers für die Extraktion von DNA grampositiver Bakterien entsprechend wenig modifiziert, ebenso das Protokoll für die DNA-Extraktion aus maximal 25 mg tierischen Gewebes.

##### **3.3.2.4.1.1 DNA-Extraktion aus den Borrelien**

Die zu Borrelien wurden bis auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  konzentriert und aus diesen Zellen wie zuvor beschrieben durch Zentrifugation ein Bakterienpellet hergestellt. Dieses wurde nach mehrmaligem Waschen in 200 µl PBS und erneuter Zentrifugation bei +4 °C in 180 µl sterilem PBS suspendiert. Anschließend wurden die DNA laut dem Protokoll des Kit-Herstellers extrahiert. Die DNA wurde in 100 µl Aqua dest. eluiert. Anschließend erfolgte die spektrofotometrische Bestimmung der Reinheit und der DNA-Konzentration. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -30 °C in 1,5-ml Reaktionsgefäßen eingefroren.

##### **3.3.2.4.1.2 DNA-Extraktion aus den murinen Geweben**

Entsprechend des empfohlenen Herstellerprotokolls (Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit, Mini Spin Column Protocol; Qiagen, Hilden) wurden zur DNA-Extraktion 25 mg Gewebe verwendet. Die

Gewebe von Ohr und Rückenhaut ausgewählter Mäuse wurde gewogen, mittels eines Skalpell zerkleinert und folgend des Protokolls wurde die murine DNA extrahiert und in 100 µl Aqua dest. eluiert. Da mehrere Proben gleichzeitig bearbeitet wurden, wurde zur Kontrolle von Kreuzkontaminationen ebenfalls Aqua dest. als Negativprobe mitgeführt und auch hier spektrofotometrisch die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls bei -30 °C.

#### **3.3.2.4.2 DNA-Extraktion unter Verwendung von Phenol-Chloroform**

Für die Erstellung einer Standard-Verdünnungsreihe zur Quantifizierung der Borrelienlast in murinen Geweben musste eine DNA-Verdünnungsreihe der entsprechenden Borrelienspezies von  $10^7$  bis  $10^{-2}$  erstellt werden. Diese sollte, um unspezifische Hintergrundreaktionen durch DNA des Gewebes in die quantitative Berechnung einzubeziehen, mit muriner DNA vermengt werden. Da zu diesem Zweck große Mengen von muriner DNA benötigt wurden, sind zwei nicht infizierte, weibliche Mäuse des Stammes RJOrl:SWISS aus der Tierhaltungseinheit des Max-Planck-Institutes für Evolutionäre Anthropologie, Leipzig, getötet und zur Verfügung gestellt worden. Die folgend beschriebene DNA-Extraktion basiert auf einem veröffentlichten Protokoll (ANON. 1993). Unter sterilen Bedingungen wurden den Mäusen Herz, Leber und Milz entnommen. Die Organe wurden mittels eines Skalpell zerkleinert und gewogen. Portionen von 0,5 g Gewebe wurden in ein Glasröhrchen verbracht, danach wurden jeweils 2 ml Verdauungspuffer dazugegeben. Das Gemisch wurde unter Kühlung auf Eis mittels eines Homogenisators zerkleinert. Danach wurden weitere 3,8 ml Verdauungspuffer zu dem Gewebehomogenat gegeben und das Gemisch in 15-ml Zentrifugenröhrchen verbracht. Anschließend wurden je 120 µl Proteinase K (5 mg/ml) dazugegeben und das Homogenat in 1,5-ml-Reaktionsgefäße portioniert. Danach erfolgte die Inkubation bei 50 °C auf einem Schüttelinkubator/Thermomixer bis das jeweilige Gewebe vollständig lysiert war. Die Fällung der DNA folgte mit je 6 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1), nachdem die Probe in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die wässrige Phase wurde á 700 µl auf neue Reaktionsgefäße aufgeteilt und je 70 µl 3 M Natriumacetat dazugegeben. Danach kamen 700 µl Isopropanol hinzu, welches zuvor bei -30 °C gekühlt wurde. Nach einer Inkubation von 35 min bei -80 °C folgte eine Zentrifugation (5 min,  $20.000 \times g$ ) bei der ein DNA-Pellet entstand. Dieses wurde nach einer Vakuum-Trocknung in 200 µl Aqua dest. gelöst. Danach wurden die DNA-Konzentration und die Reinheit spektrofotometrisch gemessen und die DNA bei -30 °C bis zur Verwendung eingefroren.

#### **3.3.2.4.3 PCR zur Ermittlung des Plasmidgehaltes der Borrelien**

Als Probe dienten 5 µl der Borrelien-DNA von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* PKo und *B. afzelii* Slovakia (Inokulate und Isolate) sowie *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* und *B. valaisiana* VS 116 und Rio 6 (Inokulate). Ebenfalls wurden als Negativkontrollen 5 µl Aqua dest. eingesetzt. Ein 55-µl-PCR-Ansatz enthielt damit 5 µl DNA, 4,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 × PCR-Puffer und 1,25 Units Taq Polymerase

(Komponenten des AmpliTaq® Gold Polymerase-Kits von Applied Biosystems) sowie 0,2 mM dNTPs und 1,0 µM jedes Primers. Die Primersequenzen für die Amplifikation der DNA von lp25 und lp28-1 wurden bereits veröffentlicht (LABANDEIRA-REY et al. 2001; LABANDEIRA-REY et al. 2003). Für die Verwendung in der PCR wurden sie von der Metabion International AG, Planegg-Martinsried, synthetisiert. Die PCR-Ansätze wurden mit den Primern für lp25 und lp28-1 getrennt durchgeführt. Das Temperaturschema der PCR setzte sich wie folgt zusammen: 94 °C für 3 min; 40 Zyklen mit jeweils 94 °C für 1 min, 45 °C für 1 min und 72 °C für 2 min; sowie ein Zyklus bei 72 °C für 6 min.

#### **3.3.2.4.3.1 Auswertung der PCR-Ergebnisse**

Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten DNA im 1,6 %igen Agarosegel mittels der Färbung mit Ethidiumbromid. Neben einem 1000-bp-DNA-Marker wurden 20 µl jedes Amplifikates mit 5 µl Probenpuffer (5×) vermengt und in eine Geltasche verbracht. Die Auftrennung der DNA-Produkte nach ihrer Größe in Basenpaaren (bp), bzw. erfolgte in 1 × TBE für 45 min bei 140 V. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung in 1 × TBE für 20 min gefärbt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht visualisiert und fotografiert. Die Identifikation spezifischer Produkte erfolgte anhand des DNA-Markers. Die spezifischen Amplifikate für lp25 waren 618 bp und für lp28-1 291 bp groß.

#### **3.3.2.4.4 Quantitative real-time PCR (qPCR) unter Verwendung der Taq Man Sonde**

Folgend ist die qPCR für die Detektion von Borrelien-DNA in den Geweben von Ohr und Rückenhaut der inokulierten Mäuse beschrieben. Hierbei wird das *ospA*-Gen nachgewiesen. Es konnte je ein neues Protokoll für *B. garinii*, *B. afzelii* sowie *B. spielmanii* etabliert werden. Das Protokoll für die Detektion von *B. burgdorferi* s.s., wie auch die Sequenzen für entsprechende Primer und Sonde wurde veröffentlicht (STRAUBINGER 2000a). Diese wurde als Grundlage für den Aufbau des beschriebenen Verfahrens verwendet. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die bereits für *B. burgdorferi*-s.s.-*ospA* bekannte Sonde erfolgreich auch *ospA* von *B. garinii* und *B. afzelii* detektiert, nicht aber von *B. spielmanii*.

##### **3.3.2.4.4.1 Herstellung der DNA-Verdünnungsreihen für die Standardkurve**

Zum Nachweis jeder oben genannten Borrelienspezies wurde eine eigene DNA-Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die extrahierte DNA aus  $10^7$  Borrelien wie unter 3.3.2.4.1.1 beschrieben extrahiert, aber in nur 55 µl Aqua dest. eluiert wurde. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in Aqua dest. hergestellt, die die DNA von  $10^6$  Borrelien bis zu  $10^{-2}$  Borrelien enthielt. Anschließend wurden diese DNA-Verdünnungen in jeweils 200 µl der unter Kapitel 3.3.2.4.2 beschriebenen, extrahierten murinen DNA überführt. Die finale Konzentration dieser DNA-Gemische aus muriner DNA und Borrelien-DNA lag bei 240 ng DNA/µl. Ausgehend davon wurden zum Austesten der optimalen DNA-Konzentration für die qPCR von der Verdünnungsreihe mit 240 ng/µl DNA nochmals 1:2, 1:4

und 1:10 verdünnt, so dass nun insgesamt vier Standardkurven mit 240 ng/μl, 120 ng/μl, 60 ng/μl und 24 ng/μl je *Borrelia*-Spezies zur Verfügung standen.

#### 3.3.2.4.4.2 Durchführung der qPCR

Zunächst wurden die Primer für *B.-garinii*-, *B.-afzelii*- und *B.-spielmanii-ospA* anhand der veröffentlichten Genomsequenzen für *ospA* mit Hilfe eines Computerprogramms (DNA Star®) ausgewählt. Ebenfalls wurde eine neue Sonde für die Detektion der *B.-spielmanii*-spezifischen Sequenz erstellt. Die Sequenzen sind folgend in der Tabelle 7 abgebildet. Ein 27,5-μl-Reaktionsansatz für eine DNA-Probe beinhaltete 2,5 μl DNA und 25 μl des Mastermix-Reagenzes. Dabei wurde jede Probe als Triplet angesetzt. Die murinen DANN-Proben, sowie eine *Borrelia*-DANN-Positivkontrolle, als auch DNA einer nicht infizierten Maus und mehrere Reaktionsansätze mit 2,5 μl Aqua dest. anstatt DNA wurden mit der Standardkurve für die jeweilige *Borrelia*-Spezies auf eine 96-Kavitätenplatte pipettiert. Dabei wurde zunächst die DNA-Probe in eine Kavität gegeben, darauf dann das Reaktionsgemisch mit den Primern und weiteren Reagenzien. Die Platte wurde mit Thermofolie verschlossen und kurz bei 4000 × g zentrifugiert. Anschließend wurden die PCR, die Fluoreszenzzunahme und die Erfassung der C<sub>T</sub>-Werte mit einem iCycler™ (BioRad) durchgeführt. Die Konzentration der zu untersuchenden DNA -Probe aus 25 mg murinem Gewebe wurde genau auf den DNA-Gehalt der Standardverdünnungsreihe gebracht, um eine möglichst exakte quantitative Aussage über den *Borrelia*-Gehalt pro μg DNA aus 25 mg Gewebe zu erhalten. Nach mehreren Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass die Standard-Verdünnungsreihen mit einem Gesamt-DNA-Konzentration von 120 ng/μl (entsprechend 300 ng/Reaktionsansatz) die kontinuierlichsten Ergebnisse bezüglich Steigung der Geraden, Effizienz und Sensitivität ergab. Deshalb wurde die qPCR folgend mit diesen Standardverdünnungen und der DNA-Konzentration der Proben von 300 ng pro 2,5-μl Reaktionsansatz durchgeführt.

Tabelle 7: Sequenzen von Primern und Sonden zum Nachweis von *ospA*

Primer und Sonden	5'-3'-Nukleotid-Sequenzen	Produkt (bp)
<i>Bb ospA</i>		104
Bb-N40-ospA-17F	AAT GTT AGC AGC CTT GAC GAG AA	
Bb-N40-ospA-119R	GAT CGT ACT TGC CGT CTT TGT TT	
ospA-Bb N40-41T:	Fam-AACAGCGTTTCAGTAGATTTGCCTGGTGA- Tamra	
<i>Bg ospA</i>		103
Bg-PBi-ospA-16F	AAA TGT TAG CAG CCT TGA TGA AA	
Bg-PBi-ospA-119R	GAC TGT AAT TAC CAT CTT TGT CTT T	
<i>Ba ospA</i>		102
BaPKo-ospA-15F	AAA ATG TTA GCA GCC TTG ATG AA	
BaPKo-ospA-119R	GAC TGT ACT TAC CGT CTT TGT CTT	
<i>Bspi ospA</i>		103
Bsp-ospA-F	AAT GTT AGC GGC CTT GAC GAG AA	
Bsp-ospA-R	AGG CTG TAT TTA CCG TCT TTG TCC T	
Bsp-ospA-S	Fam-AACAGCACTTCAGTAGATGTACCTGG-Tamra	



### 3.3.2.4.4.3 Auswertung der qPCR

Mittels der Hersteller-Software des iCyclers iQ5<sup>®</sup> wurde, bezogen auf die entstehenden Fluoreszenz-Signale jeder DNA-Verdünnungsstufe, ein Schwellenwert (Threshold) berechnet, oberhalb dessen die Fluoreszenz-Signale mit aussagekräftigen, messbaren Werten je nach Amplifikationszyklus quantitativ als C<sub>t</sub>-Werte berechnet wurden. Damit konnte die potenziell enthaltene Zahl der Borrelien in einer 300-ng-DNA-Probe berechnet werden. Die PCRs wurden mehrmals durchgeführt, um methodische Fehlerquellen zu minimieren. Die quantitativen Berechnungen der potenziellen Erregerzahlen in jedem PCR-Experiment erfolgten auf Basis der Standard-Verdünnungsreihen. Mit der Messung der C<sub>t</sub>-Werte jeder Verdünnungsstufe errechnete das Computerprogramm eine Steigung, aus welcher wiederum die Effizienz der PCR-Reaktion in Prozent ermittelt wurde. Abbildung 12 zeigt eine solche Steigungsgerade für die Detektion von *B. burgdorferi* s.s. N40.

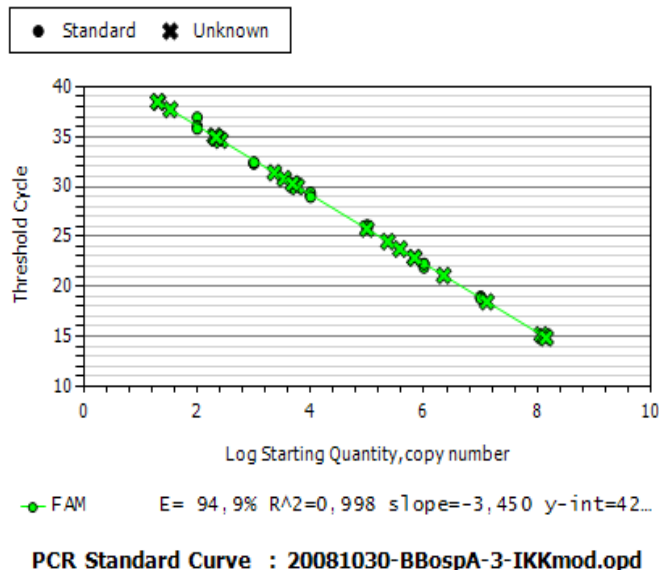


Abbildung 12: Beispiel für eine Steigungsgerade der quantitativen PCR zur Detektion von *B. burgdorferi* s.s. N40

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der serologischen Studie

#### 4.1.1 Auswertung der Vorberichte

Die Vorberichte dienten besonders der Rückverfolgung von antibiotischen Behandlungen vor der Studie, welche die C6-Antikörperspiegel beeinflussen könnten sowie der Anamnese als wichtiger Bestandteil der abschließenden diagnostischen Befunderhebung. Für einen allgemeinen Überblick erfolgte zunächst eine quantitative Auswertung der einzelnen Fragebogenkategorien. In den Tabellen E11 bis E14 (Anhang Tabellen) werden diese Ergebnisse detailliert für jede Tierarztpraxis dargestellt. Von den 510 untersuchten Hunden waren laut Vorbericht 22,8 % (n = 116) gegen eine Lyme-Borreliose-Infektion geimpft, wobei für 3,1 % (n = 16) der Hunde der Impfstatus unbekannt war (Abbildung 13 und Tabelle E11). Je nach Tierarztpraxis lag der Prozentsatz der geimpften Hunde zwischen 3,7 % (Praxis 6, Erfurt) und 47,1 % (Praxis 1, Hamburg). Für durchschnittlich 44,5 % (n = 227) der untersuchten Hunde wurde eine Behandlung mit Antibiotika innerhalb der letzten zwei Jahre angegeben.

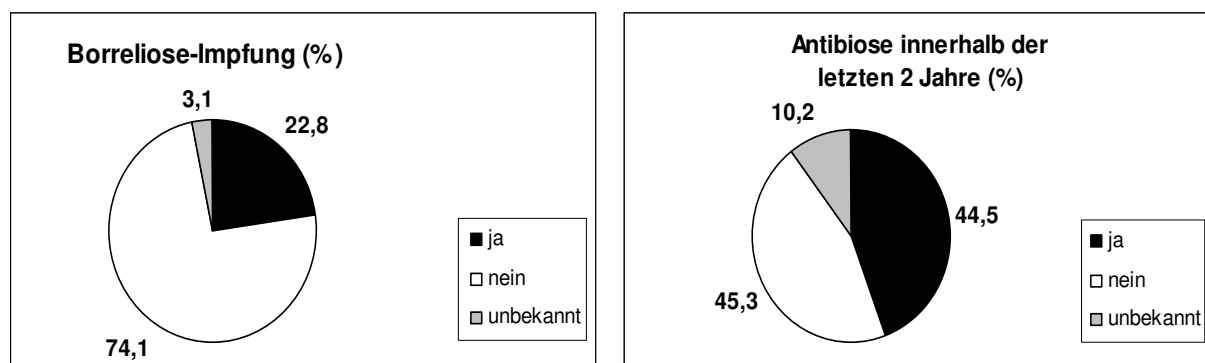


Abbildung 13: Auswertung der Vorberichte: Lyme-Borreliose-Impfung und Antibiose

Hier waren praxisabhängig Anteile von 20,7 % (Praxis 5, Düsseldorf) bis zu 63,0 % (Praxis 6, Erfurt) zu verzeichnen. Bei 10,2 % aller untersuchten Hunde war es unbekannt, ob in diesem Zeitraum eine antibiotische Behandlung erfolgte (alle Daten in Tabelle E11). Es zeigte sich, dass in 35,2 % der Fälle (n = 80) Amoxicillin verwendet wurde, bei 10,1 % (n = 23) der Hunde kamen Wirkstoffe aus der Gruppe der Cephalosporine zur Verwendung. Des Weiteren erhielten 7,9 % (n = 18) Penicilline (außer Amoxicillin) und 7,6 % der Hunde (n = 17) wurden mit Doxycyclin behandelt. Die verbleibenden 39,2 % (n = 89) der Hunde erhielten andere Wirkstoffe (Tabelle E12, Anhang). Insgesamt erwiesen sich zwischen den Tierarztpraxen große Unterschiede. Während zum Beispiel Tierarztpraxis 3 zu 73,5 % Amoxicillin für die Antibiose verwendete, wurde dieser Wirkstoff in Tierarztpraxis 8 überhaupt nicht eingesetzt. Es wurden vielmehr andere Penicilline (77,7 %) verwendet. In nur 5,7 % der Fälle (n = 13) erfolgte die antibiotische Behandlung auf Grund einer

Lyme-Borreliose. Dazu wurde vorwiegend Doxycyclin (92,3 %, n = 12) verwendet, gefolgt von Amoxicillin bei einem Hund (7,7 %). In Tabelle E13 im Anhang wurde zunächst die Frage nach dem Vorliegen von klinischen Symptomen oder Erkrankungen analysiert. Hier wurden allgemeine Symptome dargestellt, die auf eine klinische Lyme-Borreliose hindeuten könnten. Von den 510 Hunden wurden für insgesamt 48,6 % (n = 248) Krankheitsanzeichen angegeben. Dagegen wurden in 51,4 % der Fälle (n = 262) keine Veränderungen angegeben und der Hund als klinisch gesund am Tag der Blutentnahme bezeichnet. Von den 248 Hunden mit klinischen Veränderungen wiesen 12,1 % (n = 30) eine Lahmheit und lediglich 1,6 % (n = 4) Symptome wie Müdigkeit oder Fieber auf. Die restlichen 86,3 % (n = 214) entfielen auf andere klinische Veränderungen (Abbildung 14).

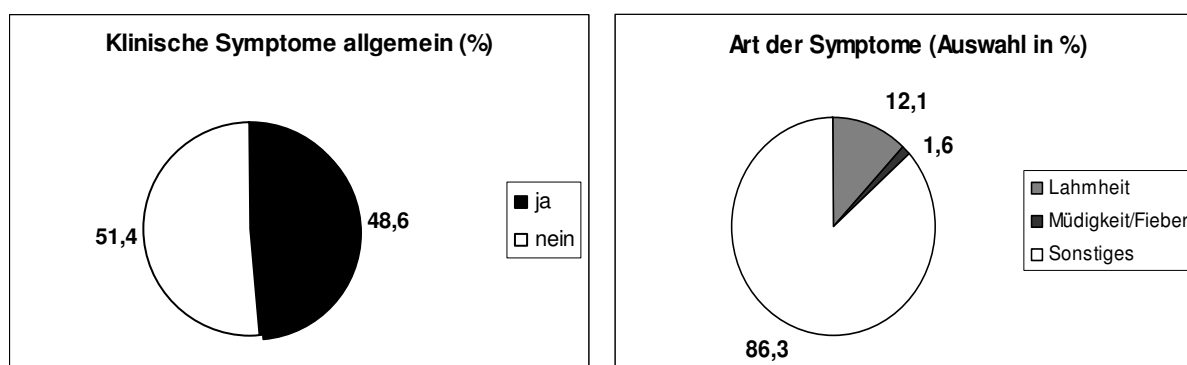


Abbildung 14: Auswertung der Vorberichte: Klinische Symptome

In Tabelle E14 (Anhang) wurde eine bereits vor der serologischen Studie diagnostizierte Lyme-Borreliose-Erkrankung erfragt, wobei zunächst nicht zwischen klinischer Erkrankung und Laborbefund differenziert wurde. Bei der Auswertung der Fragebögen zeigte sich, dass diese gestellte Diagnose nicht mit Sicherheit labordiagnostisch erfolgte, deshalb wurde zusätzlich die Kategorie einer Verdachtsdiagnose eingefügt. In diesen Fällen (0,6 % aller untersuchten Hunde; n = 3) konnten sich die Besitzer oder die Tierärzte des Befundes nicht erinnern, gaben aber an, der Hund habe eine Borrelioseinfektion. Für zwölf Hunde (2,3 %) lag ein serodiagnostischer Befund vor. Insgesamt war bei somit 2,9 % der untersuchten Hunde bereits eine Lyme-Borreliose-Infektion vorberichtlich erwähnt worden. Der größte Anteil lag hier bei der Tierarztpraxis 1 mit sechs Hunden. Zusätzlich wurde bei den Hunden mit einer erwähnten Lyme-Borreliose analysiert, ob gleichzeitig Krankheitssymptome angegeben wurden. Es wurden die Parameter Lahmheit, Fieber und Glomerulonephritis ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass bei 60 % (n = 9) dieser Hunde keinerlei klinische Krankheitssymptome vorlagen. Dagegen wurde bei 33,3 % (n = 5) eine Lahmheit, bei einem Hund (6,7 %) eine Glomerulonephritis und bei keinem der Hunde vorberichtlich Fieber angegeben. Trotz des Mangels an fundierten wissenschaftlichen Daten werden von Tierärzten und Besitzern immer wieder neurologische Störungen wie epileptiforme Anfälle als Grund für eine serologische Untersuchung von Hunden auf Lyme-Borrelien-Antikörper angegeben. Deshalb wurden

in dieser Studie entsprechende Vorberichte ebenfalls ausgewertet. Fünf von allen untersuchten Hunden (0,98 %) litten demnach unter epileptiformen Anfällen oder unklaren Anfällen, wovon vier Hunde zu dem Kundenstamm der Tierarztpraxis 8 gehörten. Eine Epilepsie wurde bei zwei Hunden (0,4 %) angegeben, einer der Hunde stammte aus Tierarztpraxis 8. Ein Hund wies ein Vestibularsyndrom (IKK-3-84) auf und ein Hund (IKK-3-50) hatte Synkopen (beide Tierarztpraxis 3). Insgesamt lagen bei zehn Hunden (4,1 %) von den Hunden mit Krankheitssymptomen neurologische bzw. zentralnervöse Störungen vor. Davon entfielen in Tierarztpraxis 8 31,6 % der Hunde mit Symptomen in diese Kategorie, von denen vier mit Procain-Penicillinen vorbehandelt wurden.

### 4.1.2 Serologische Untersuchungen der 1. Blutproben

#### 4.1.2.1 Ergebnisse des Zweistufentests und C6-Schnelltests

Zunächst wurde jede erhaltene Serumprobe im Zweistufentest untersucht. Im Falle von hier ermittelten Infektionsantikörpern oder bei unklaren Befunden erfolgte anschließend der C6-Schnelltest (4Dx<sup>®</sup> SNAP<sup>®</sup>). Die Ergebnisse des KELA finden sich im Anhang, Abbildung A2 bis A4. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist detailliert im Anhang, Tabelle E15, sowie in Abbildung 15 dargestellt.

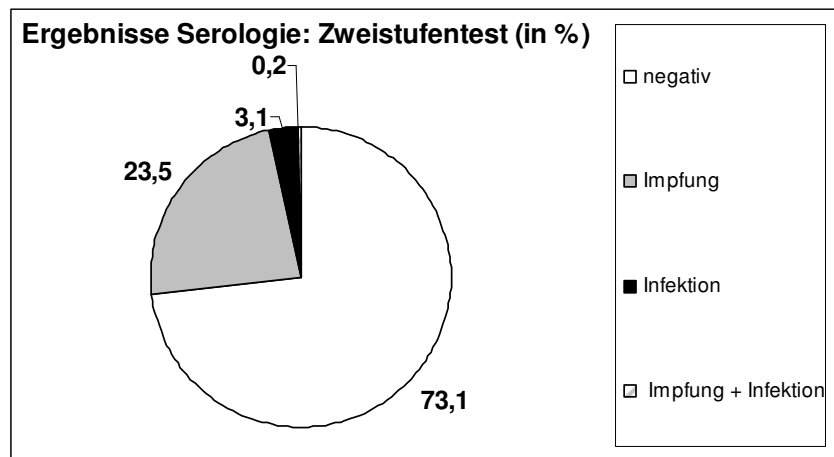


Abbildung 15: Ergebnisse der Zweistufentests aller untersuchter Hunde (n = 510)

Insgesamt 73,1 % (n = 373) der untersuchten Hundesera wurden als negativ bewertet; den geringsten Anteil seronegativer Hunde wies Tierarztpraxis 8 mit 46,6 % (n = 14) auf, den höchsten Anteil Tierarztpraxis 4 und 9 mit jeweils 77,7 % (n = 21 bzw. n = 63). Der Anteil von Hunden mit impfspezifischen Antikörpern (Impfung) lag bei insgesamt 23,5 % (n = 120). Dabei wies Tierarztpraxis 8 mit 46,6 % (n = 14) den höchsten Impfanteil auf, aus Tierarztpraxis 6 wurde kein Hund gegen eine Lyme-Borreliose-Infektion geimpft. Mittels des Zweistufentests festgestellte Reaktionen, die auf eine Infektion mit Borrelien hinwiesen, wurden bei 3,1 % der getesteten Hunde (n = 16) festgestellt. Ein Hund aus Tierarztpraxis 9 (0,2 %) wies impf- und infektionsspezifische

Antikörper gleichzeitig auf. Damit lag der Anteil potenziell infizierter Hunde ( $n = 17$ ) bei insgesamt 3,3 %. Dies entspricht auch der Zahl an Infektionen, die serologisch mit Antikörpern gegen das C6-Peptid nachgewiesen wurden (3,3 %;  $n = 17$ ) und damit einer Übereinstimmung von 100,0 %. Zusätzlich wurden bei 13 der 17 potenziell infizierten Hunde (anteilig 76,5 %) gleichzeitig Antikörper gegen *A. phagocytophilum* (Ap) nachgewiesen. Keines der 17 getesteten Sera wies Immunreaktionen gegen *E. canis* oder *D. immitis* auf. Im Falle eines positiven KELAs und negativen Western-Blots (unspezifische Immunreaktionen, 8,6 %; Tabelle E15) wurde das Serum insgesamt als negativ beurteilt. Dennoch wurde ebenfalls ein SNAP<sup>®</sup>4Dx<sup>®</sup>-Test durchgeführt. Es zeigte sich, dass keiner dieser 44 Hunde C6-Antikörper oder Antikörper gegen *A. phagocytophilum*, *E. canis* oder *D. immitis* aufwies.

In Abbildung 16 ist ein Lysat-Antigen-Western-Blot dargestellt. Hier sind entsprechend der zuvor beschriebenen Auswertungskriterien die spezifischen Proteinbanden für eine Impfung und eine Infektion markiert worden. Es lassen sich zunächst die geimpften Hunde (Nr.3, IKK-5-71; Nr.10, IKK-5-76; Nr. 11, IKK-5-77; Nr. 12, IKK-5-78) mit den markanten OspA- und OspB-spezifischen Antikörperreaktionen deutlich abgrenzen. Für alle vier Sera wurden im Vorbericht bereits Borreliose-Impfungen angegeben, wobei diese unter zwölf Monate zurücklagen. Serum Nr. 2 (IKK-1-35) zeigt im Bereich von OspA sehr schwache Antikörperreaktionen, die sich mit dem Vorbericht einer bereits über zwei Jahre zurückliegenden Lyme-Borreliose-Impfung und dem positiven KELA (268,1 Units, Abbildung A2 im Anhang) decken. Bei Serum 13 (IKK-5-79), war trotz eines positiven KELAs mit 286,1 Units (Abbildung A3) keine Reaktion auf dem Western-Blot abzulesen. Die Sera Nr. 15 (IKK-2-55) und 16 (IKK-2-42) repräsentieren Hunde mit infektionsspezifischen Antikörpern. Der erfolgte C6-Schnelltest war im Falle von IKK-2-42 zusätzlich positiv für *A. phagocytophilum*. Beide Sera reagierten positiv gegenüber dem C6-Peptid. Die restlichen hier untersuchten Sera wurden abschließend als negativ mit im ELISA unspezifischen Antikörperreaktionen beurteilt. Dies galt zum Beispiel für die Sera Nr. 6 - 8 (IKK-1-26, IKK1-28 und IKK-1-29), die nur bei ca. 66 kDa schwache Banden aufwiesen. Das Serum Nr. 9 (IKK-5-75) zeigte ebenfalls einen schwach positiven KELA mit 107,6 Einheiten (Abbildung A3 im Anhang), jedoch keine Antikörperreaktionen im Western-Blot. Das Serum Nr. 14 (IKK-5-80) reagierte positiv im KELA mit 123,9 Einheiten, doch negativ im Western-Blot. Im Fall von Nr. 1 (IKK-7-20) und Nr. 4 (IKK-5-53) erfolgte trotz eines negativen KELAs die Untersuchung auf dem Western-Blot auf Wunsch der Hundebesitzer. Die Sera wurden sowohl in KELA als auch Western-Blot als seronegativ eingestuft, es waren keine spezifischen Proteinbanden zu sehen.

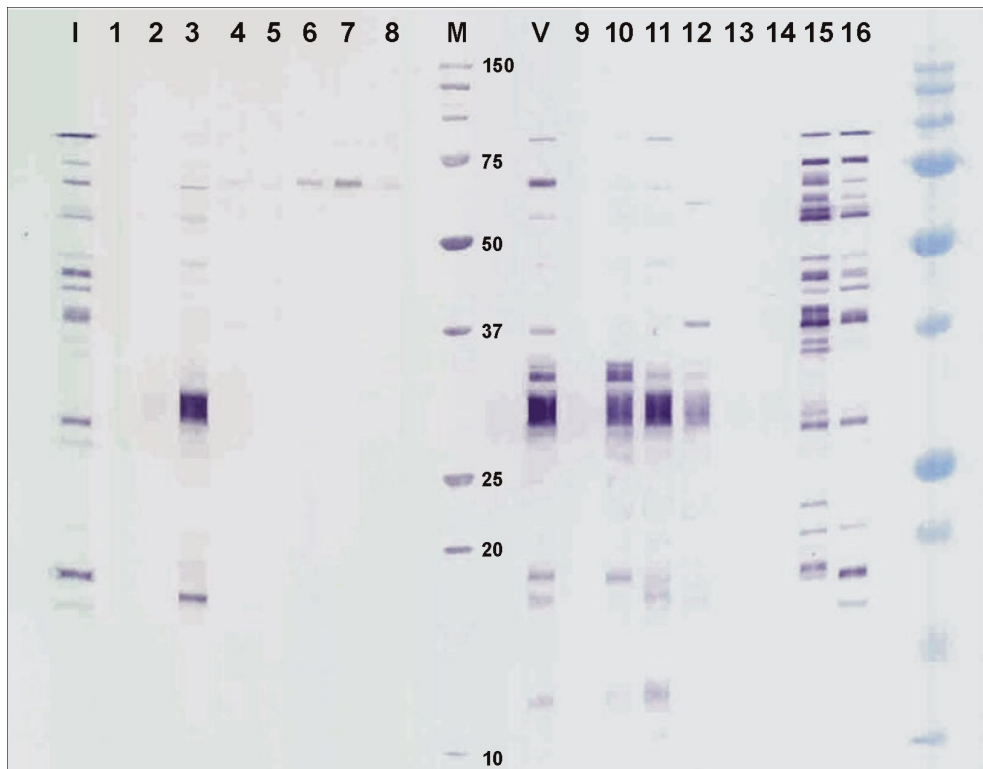


Abbildung 16: IgG-Antikörperreaktionen gegenüber *B.-burgdorferi-s.s.*-Lysat-Antigen im Western-Blot

I:	Serum eines experimentell infizierten Hundes			
V:	Serum eines experimentell geimpften Hundes			
M:	Proteinmarker mit Proteinbanden in kDa			
1:	IKK-7-20	9:	IKK-5-75	
2:	IKK-1-35	10:	IKK-5-76	
3:	IKK-5-71	11:	IKK-5-77	
4:	IKK-5-53	12:	IKK-5-78	
5:	IKK-5-60	13:	IKK-5-79	
6:	IKK-1-26	14:	IKK-5-80	
7:	IKK-1-28	15:	IKK-2-55	
8:	IKK-1-29	16:	IKK-2-42	

#### 4.1.2.2 Übereinstimmung von Vorbericht und serologischen Untersuchungsergebnissen

Hier wurden die Vorberichte, in denen eine Lyme-Borreliose-Infektion angegeben bzw. vermutet wurde, mit den serologisch ermittelten Ergebnissen verglichen (Tabelle E16, Anhang Tabellen und Abbildung 17). Nur in einem Fall (Tierarztpraxis 7) konnte eine bereits im Fragebogen angegebene Infektion bestätigt werden, dies entsprach insgesamt 6,7 % der vorberichtlich angegebenen Lyme-Borreliose-Infektionen (n = 15). Für die übrigen 14 Hunde (93,3 %) konnten keine infektionsspezifischen Antikörper nachgewiesen werden, weshalb diese als falsch-positiv gewertet wurden. Bis auf die oben für Tierarztpraxis 7 erwähnte bestätigte Infektion handelt es sich bei den

übrigen 16 Infektionen um neu ermittelte Befunde. Ein großer Teil der vorberichtlich angegebenen Impfungen (22,8 %) konnte serologisch (23,5 %) ebenfalls nachgewiesen werden.

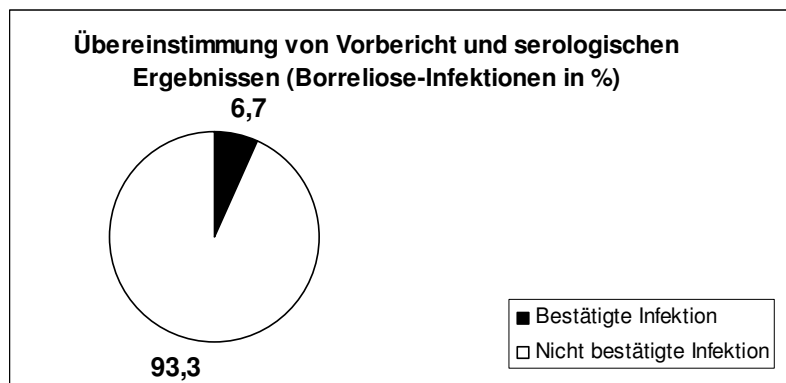


Abbildung 17: Übereinstimmung von Vorbericht und serologischen Ergebnissen

### **4.1.3 Vergleich der Ergebnisse vor und nach der Therapie mit Antibiotika**

#### **4.1.3.1 Ausgewählte Hunde und Vorberichte**

Insgesamt kamen 17 der 510 untersuchten Hunde für eine antibiotische Therapie in Frage, da sie neben der mittels Zweistufentest nachgewiesenen Infektion auch entsprechende hochspezifische C6-Antikörper-Reaktionen aufwiesen. Die vorberichtlichen Daten der Hunde sind in Tabelle E17.1 und E17.2 im Anhang aufgelistet. Keiner der Hunde sollte gegen eine Lyme-Borreliose-Infektion geimpft sein, wobei sechs Hunde (35,3 %) prädiagnostisch aus diversen Gründen mit unterschiedlichen Wirkstoffen antibiotisch vorbehandelt wurden, was bis zu 2,5 Jahre zurücklag. Nach der Information der Tierärzte über den serologischen Befund wurde bei allen 17 Hunden eine antibiotische Therapie eingeleitet. Die Hundebesitzer wurden gebeten, vier bis sechs Monate nach Entnahme der 1. Blutprobe bzw. der eingeleiteten Antibiose erneut eine Blutentnahme bei ihrem Hund durchführen zu lassen. Wie bereits erwähnt, wurden auf Grund der geringen Anzahl von 17 Hunden, die für eine Antibiose in Frage kamen, retrospektiv weitere zwölf Hunde aus der Datenbank der Borreliose-Routinediagnostik ausgewählt. Diese Hunde waren zuvor in Zweistufentest und C6-Schnelltest positiv für eine Infektion getestet und wurden anschließend antibiotisch behandelt. Die Besitzer der Hunde erlaubten eine zweite Blutentnahme durch die behandelnden Tierärzte (Tabelle E10, Anhang).

#### **4.1.3.2 Therapie mit Antibiotika und Symptomentwicklung**

Die Daten der Antibiose mit Wirkstoffen, Zeiträumen zwischen 1. und 2. Blutprobe, sowie ein Vergleich der Krankheitssymptome vor und nach der Antibiose sind in Tabelle 18, Anhang und Tabelle 8 dargestellt. Bei zwei Hunden wurde die Antibiose nicht vollendet (IKK-8-02 und IKK 9-06). Die Hundebesitzer brachen die Therapie auf eigenen Wunsch hin ab, bzw. Hund IKK-9-06 verstarb (wegen anderer Gründe). Bis auf Tierarztpraxis 7 (Hund IKK-7-04, mit Amoxicillin + Clavulansäure behandelt) entschieden sich alle Tierarztpraxen für die 28-tägige Behandlung mit

Doxycyclin. Vor der Therapie wiesen 14 der behandelten Hunde (82,4 %) keinerlei klinische Symptome auf. Bei zwölf von 15 Hunden mit zweiter Blutuntersuchung (80,0 %) waren sowohl vor als auch nach der Antibiose keine Symptome nachweisbar, die auf eine Borreliose hindeuteten. Bei zwei Hunden (13,3 %; IKK-2-67 und IKK-6-01), die vorberichtlich klinische Symptome (hier: Lahmheit) aufwiesen, waren diese Symptome bei Entnahme der 2. Blutprobe nicht mehr nachweisbar. Ein Hund war zum Zeitpunkt der 2. Blutentnahme an einer Glomerulonephritis erkrankt. Der Großteil der Hunde konnte im Rahmen der für die Studie vorgegebenen Zeit von 4 bis 6 Monaten zwischen 1. und 2. Blutprobe untersucht werden. Bei fünf Hunden lag der Zeitraum zwischen 7 und 8 Monaten.

Tabelle 8: Entwicklung der klinischen Symptome vor und nach der antibiotischen Therapie

<b>Vor der antibiotischen Therapie</b>	<b>Hunde</b>	<b>% von allen (n = 17)</b>
Symptome	3	17,6
Keine Symptome	14	82,4
Keine 2. Blutprobe/keine Daten	2	11,8
<b>Nach der antibiotischen Therapie</b>	<b>Hunde</b>	<b>% von allen (n = 15)</b>
Keine Symptome vor und nach Therapie	12	80,0
Symptome vor, keine nach Therapie	2	13,3
Symptome nur nach der Therapie	1	6,7

In Tabelle E19 (Anhang Tabellen) sind die Stammdaten der zwölf Hunde aufgeführt, die anhand der retrospektiven Datenbank-Recherche für die serologischen Untersuchungen ergänzt wurden. Alle Hunde reagierten in Zweistufentest und C6-Schnelltest positiv, wobei bei einem Hund (IKK-50-01) eine Impfung und Infektion festgestellt wurde. Bei diesem Tier, sowie zwei weiteren (IKK-50-02 und IKK-50-10) wurden die antibiotischen Therapien nicht abgeschlossen. Alle hier untersuchten Hunde wurden mit Doxycyclin behandelt. Die Zeiträume zwischen der Entnahme der 1. und 2. Blutprobe betrugen zwischen 7 und 18 Monaten. Vor der Therapie wiesen fünf Hunde eine Lahmheit auf, wobei diese bei zwei Hunden auch nach der Therapie noch vorhanden war (IKK-50-07 und IKK-50-12), bei einem anderen wurde eine Arthritis der Zehengelenke diagnostiziert (IKK-50-09). Ein Hund (IKK-50-06) zeigte vor Therapiebeginn Fieber, ein anderer Müdigkeit. Bei drei Hunden konnten retrospektiv keine Angaben (k.A.) zu klinischen Veränderungen vor der Therapie gemacht werden. Bei zwei dieser Hunde (IKK-50-03 und IKK-50-04) waren nach der Therapie keine klinischen Symptome nachweisbar, dagegen lag bei dem dritten Hund (IKK-50-11) zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme eine Kreuzbandruptur vor.

### **4.1.3.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen vor und nach der Therapie**

Unter Einbeziehung der oben genannten zwölf Sera aus der Routine-Lyme-Borreliose-Diagnostik konnten nun insgesamt 29 Hunde, die positiv auf das C6-Peptid reagierten, in die Untersuchung des



Verlaufes der Immunreaktionen vor und nach einer antibiotischen Therapie einbezogen werden. Allerdings lag für zwei Hunde (IKK-8-02 und IKK-9-06) nur jeweils die 1. Blutprobe vor, so dass insgesamt 27 Hundesera vollständig untersucht werden konnten. Mit den vor der antibiotischen Therapie gewonnen Sera konnte zusätzlich ein C6-Peptid-spezifischer ELISA durchgeführt werden. Damit sollte die Kreuzreaktivität von C6-Antikörpern gegenüber speziesspezifischen Borrelien-C6-Peptiden untersucht werden.

#### 4.1.3.3.1 KELA

Bei 19 (70,4 %) der 27 untersuchten Hunde war eine deutliche Reduktion der Antikörperspiegel gegenüber der 1. Blutprobe zu verzeichnen, wobei dieses sehr unterschiedlich stark ausfiel (Abbildung 18). Bei den Hunden IKK-1-22, IKK-2-42, IKK-8-13, IKK-9-24, IKK-9-65, IKK-50-05 und IKK-50-12 war sie sehr deutlich. Demgegenüber stehen Hunde, bei denen das Sinken weniger stark ausgeprägt war (IKK-5-42, IKK-7-04, IKK-9-81, oder IKK-50-11) oder die Antikörperspiegel ohne Einbeziehung des Standardfehlers im Falle von fünf Hunden gestiegen sind (IKK-2-32, IKK-2-55, IKK-9-35, IKK-50-04 und IKK-50-06).

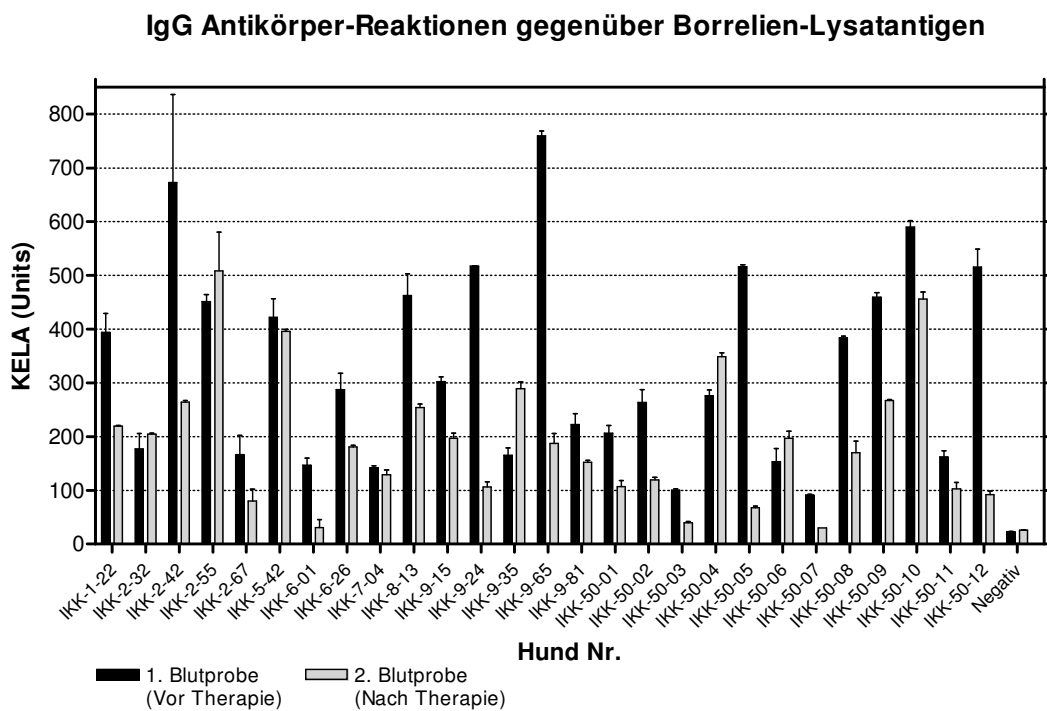


Abbildung 18: Ergebnisse des KELA vor und nach der Therapie mit Antibiotika

### **4.1.3.3.2 Untersuchungen mit dem kommerziellen Western-Blot**

Um eine direkte Vergleichbarkeit der Immunantworten gegenüber Lysat-Antigen-Proteinen vor und nach der antibiotischen Therapie zu ermöglichen, die auch die Entwicklung der Immunantwort gegenüber VlsE zeigten, wurde der kommerzielle Western-Blot verwendet. Die Sera der 1. und 2. Blutproben wurden vergleichend untersucht und ausgewertet (Abbildungen 19 bis 21). In Abbildung 19 finden sich die Western-Blots von Hundesera, die serologisch deutlich mit einer Abnahme der Proteinbandenintensität nach der Therapie reagierten. Dieser Gruppe konnten sieben Hundeserumproben zugeordnet werden. Bezüglich der Immunantwort gegenüber rekombinantem VlsE zeigte sich bei allen Sera außer Nr. 7a und b (IKK-50-09) eine deutliche Verringerung (Nr. 2, IKK-9-35) oder ein Verschwinden der Immunreaktion (Nr. 3, IKK-9-65; Nr. 5, IKK-50-03; Nr. 6, IKK-50-05). Die Farbintensität der Proteinbanden verringerte sich ebenfalls, wobei sich von vornherein deutliche individuelle Unterschiede abzeichneten. Während Hund IKK-9-15 (Nr. 1a) gegen nahezu alle spezifischen Proteine eine Immunreaktion ausbildete, reagierte Hund IKK-50-03 (Nr. 5a) nur sehr schwach auf eine Lysat-Antigen-Proteinbande (p83/100). In Abbildung 20 sind vergleichend Sera der 1. und 2. Blutprobe von Hunden dargestellt, bei denen sich die Intensität der auf dem Western-Blot sichtbaren Immunreaktionen nicht oder kaum veränderte. Hierzu zählte mit 15 Hundesera ein Großteil der behandelten Tiere. Sechs der Hunde reagierten sowohl vor als auch nach der antibiotischen Therapie stark gegenüber rekombinantem VlsE (zum Beispiel Nr. 8, IKK-1-22 oder Nr. 10, IKK-2-42). Die Sera von acht Hunden zeigten schwache Immunreaktionen gegenüber VlsE bis hin zu kaum noch sichtbaren Proteinbanden wie zum Beispiel Nr. 20 und 21 (IKK-50-04 und IKK-50-06). Bei IKK-50-01 wurde vorberichtlich eine Impfung angegeben, so dass hier schwach sichtbar impf- und infektionsspezifische Proteinbanden (OspA bzw. VlsE) zu sehen sind. In Abbildung 21 ist ein Western-Blot von Sera der Hunde, denen nur eine Blutprobe entnommen werden konnte dargestellt. Bei IKK-9-06 (Nr. 23a) zeigten sich deutliche impfspezifische Banden neben infektionsspezifischen Banden (Impfung + Infektion). Vorberichtlich war aber keine Impfung angegeben worden. Auf den Streifen 25a und b (IKK-50-10) konnten ebenfalls impf- und infektionsspezifische Antikörper nachgewiesen werden.

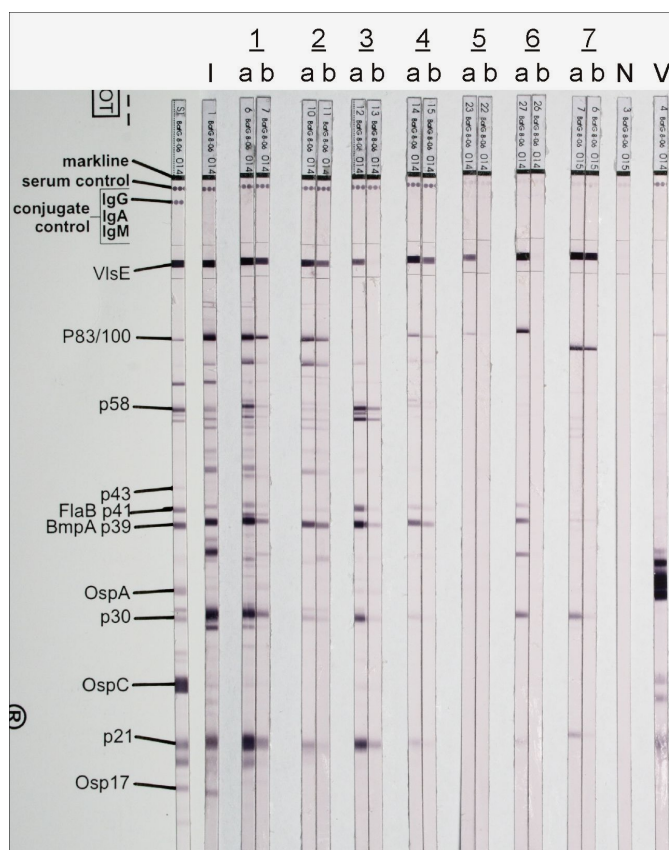


Abbildung 19: IgG-Immunantwort gegenüber Lysat-Antigen von *B. afzelii* und rekombinatem VlsE. (*Borrelia afzelii* + VlsE Eco Blot IgG, Fa. Genzyme Virotech), Hundesera mit Abschwächung der Bandenintensität nach der Antibiotikatherapie

- |    |                 |                                |
|----|-----------------|--------------------------------|
| a: | 1. Blutentnahme | (vor der Antibiotikatherapie)  |
| b: | 2. Blutentnahme | (nach der Antibiotikatherapie) |
| I: | Kontrollserum   | Infektion                      |
| V: | Kontrollserum   | Impfung                        |
| 1: | IKK-9-15        | 5: IKK-50-03                   |
| 2: | IKK-9-35        | 6: IKK-50-05                   |
| 3: | IKK-9-65        | 7: IKK-50-09                   |
| 4: | IKK-9-81        |                                |

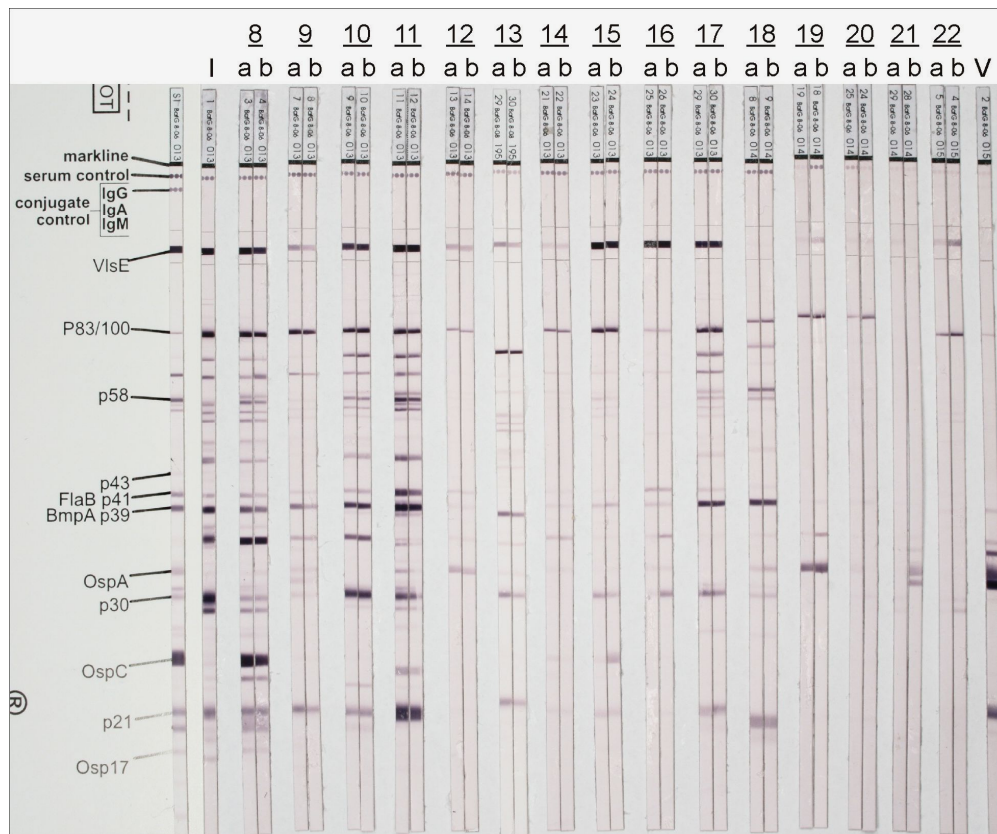


Abbildung 20: IgG-Immunantwort gegenüber Lysat-Antigen von *B. afzelii* und rekombinatem VlsE (*Borrelia afzelii* + VlsE Eco Blot IgG, Fa. Genzyme Virotech), Hundesera mit unveränderten oder intensivierten Proteinbanden-Intensitäten im Verlauf der Antibiotikatherapie

a	1. Blutentnahme	(vor der Antibiotikatherapie)		
b:	2. Blutentnahme	(nach der Antibiotikatherapie)		
I:	Kontrollserum	Infektion		
V:	Kontrollserum	Impfung		
8:	IKK-1-22	14:	IKK-6-01	20: IKK-50-04
9:	IKK-2-32	15:	IKK-6-26	21: IKK-50-06
10:	IKK-2-42	16 :	IKK-7-04	22: IKK-50-08
11:	IKK-2-55	17:	IKK-8-13	
12:	IKK-2-67	18:	IKK-9-24	
13:	IKK-5-42	19:	IKK-50-01	

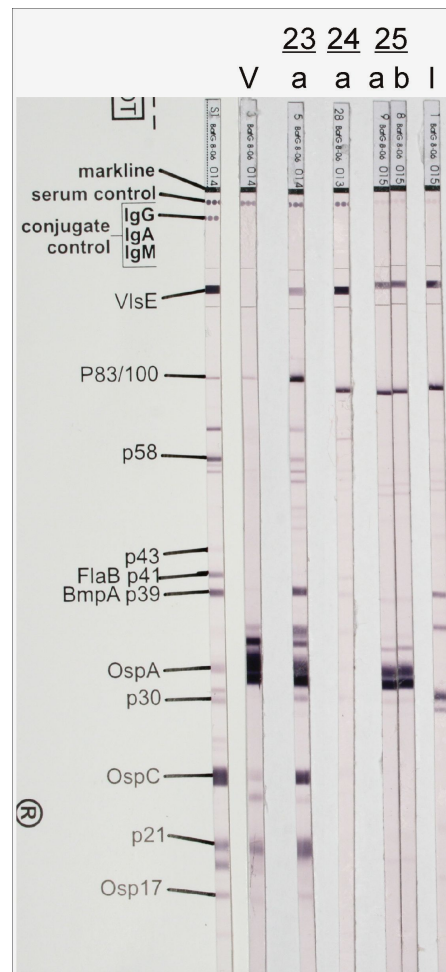


Abbildung 21: IgG-Immunantwort gegenüber Lysat-Antigen von *B. afzelii* und rekombinatem VlsE (*Borrelia afzelii* + VlsE Eco Blot IgG, Fa. Genzyme Virotech), Hundesera, die nur als Einzelprobe vorlagen, sowie eine Impfung mit gleichzeitiger Infektion

- a: 1. Blutentnahme (vor der Antibiotikatherapie)
- b: 2. Blutentnahme (nach der Antibiotikatherapie)
- Serumprobe
- I: Kontrollserum Infektion
- V: Kontrollserum Impfung
- 23: IKK-9-06
- 24: IKK-8-02
- 25: IKK-50-10

#### 4.1.3.3.3 Ergebnisse der Untersuchungen mittels C6-Schnelltest

Keines der Sera wurde positiv auf Antikörper gegen *E. canis* oder Antigen von *D. immitis* getestet. Sofern vorhanden, wurden Sera der 1. und 2. Blutprobe untersucht (n = 27). Obwohl der Test ausdrücklich nicht zum quantitativen Überprüfen der C6-Antikörperspiegel vor und nach einer Antibiose konzipiert wurde, zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede in der Farbintensität der Testergebnisse zwischen der 1. und 2. Blutprobe. Deshalb wurde zur Objektivierung der Testergebnisse eine quantitative Einordnung der Serumreaktionen gegenüber dem C6-Peptid (*B. burgdorferi*, *Bb*) und *A. phagocytophilum* (*Ap*) vorgenommen (Tabelle E20, Anhang Tabellen, Zusammenfassung in Tabelle 9). Als Orientierungspunkt diente die intensiv blau gefärbte Funktionskontrolle (Serumkontrolle) des Tests.

Tabelle 9: C6-Schnelltest-Ergebnisse vor und nach antibiotischer Therapie von 27 Hunden

Kategorie	%	Hunde
Abgeschwächte C6-Reaktion nach Therapie	77,8	21
Unverändert	18,5	5
Verstärkte C6-Reaktion	3,7	1
<i>Ap</i> - positiv vor der Therapie ( <i>Ap+Bb</i> )	55,6	15
Abgeschwächte <i>Ap</i> -Reaktion nach Therapie	40,7	11
Unverändert	11,1	3
Verstärkte <i>Ap</i> -Reaktion	3,7	1

Von den 27 Hunden wiesen 21 Hunde (77,8 %) im Test der 2. Blutprobe eine Abschwächung der C6-Antikörperreaktion gegenüber der 1. Blutprobe auf. Bei zehn dieser Hunde war keinerlei Farbreaktion mehr nachweisbar. Ein völliges Verschwinden der Farbreaktion erfolgte vorwiegend bei Tieren, die schon vor der antibiotischen Therapie schwach positiv (+) (IKK-6-01, IKK-9-24, IKK-9-81, IKK-50-03, IKK-50-06) oder sehr schwach positiv (+/-) reagierten (IKK-2-67, IKK-8-13 und IKK-50-05). Auch bei zwei Hunden (IKK-9-65 und IKK-50-11), die zuvor mittelgradig positiv (++) reagierten, war bei der 2. Blutprobe keine Serumreaktion mehr nachweisbar. Fünf Hunde (18,5 %) zeigten dagegen keine sichtbaren Veränderungen der C6-Antikörperreaktion. Sie blieben konstant hochgradig (IKK-2-55, IKK-9-35, IKK-50-08) oder mittelgradig positiv (IKK-1-22, IKK-9-15). Bei einem Hund (IKK-50-04) war ein leichter Anstieg der C6-Reaktion von sehr schwach auf schwach positiv zu verzeichnen. Fünfzehn (55,6 %) der C6-Peptid positiven Hunde wiesen gleichzeitig bei der 1. Blutprobe Immunreaktionen gegenüber *A. phagocytophilum* auf, wobei bei elf Hunden (40,7 %) ebenfalls eine verminderte Blaufärbung oder ein völliges Verschwinden (sechs Hunde) beim Test der 2. Blutprobe zu beobachten war. Bei drei *A. phagocytophilum*-seropositiven Hunden (IKK-2-67, IKK-5-42 und IKK-6-26) zeigten sich keine Veränderungen. Ein Serum (IKK-9-15) entwickelte eine

Zunahme der Farbreaktion. Die zwölf *A. phagocytophilum*-seronegativen Hunde (44,4 %) entwickelten auch im zeitlichen Verlauf der Studie keine Immunreaktion gegenüber diesem Antigen.

#### **4.1.3.3.4 Untersuchungen mit dem kommerziellen C6-ELISA**

Der Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-ELISA wurde mit allen 27 Hundesera durchgeführt, um die quantitative Entwicklung der C6-Antikörper vor und nach der antibiotischen Therapie nachzuvollziehen (Abbildung 22). Zusätzlich sind neben diesen Sera vier Positivkontrollen des Testkits (Kalibratoren) und interne Serumkontrollen (Negativ und Infektion) dargestellt, um die Höhe der Antikörperspiegel besser einordnen zu können. Laut des Testkit-Herstellers soll der Therapieerfolg der Antibiose mit diesem ELISA überprüft werden können, sofern der initial mindestens 30 Units betragende C6-Antikörperspiegel um 50 % gesunken ist und der Hund in den letzten Monaten zuvor nicht antibiotisch behandelt wurde. Im Gegensatz zu dieser Empfehlung wurde in dieser Arbeit unabhängig von der Höhe des initial ermittelten C6-Antikörpertiters und vorheriger Antibiose eine Therapie der Hunde eingeleitet, wenn C6-Schnelltest und Zweistufentest positiv ausfielen. Sehr hohe C6-Antikörperreaktionen oberhalb von OD 1,4 wurden bei den 1. Blutproben von drei Hunden (IKK-2-55, IKK-9-15 und IKK-50-12) beobachtet. Hoch- bis mittelgradig-positive C6-Antikörperreaktionen zwischen OD 1,0 und 0,4 zeigten sich bei neun Hunden (IKK-1-22, IKK-2-42, IKK-9-35, IKK-50-05, IKK-50-07 bis IKK-50-10). Dagegen wiesen elf der 27 Hunde (40,7 %) sehr schwache C6-Antikörperreaktionen unter OD 0,2 auf, wobei auch die hier nicht aufgeführten Messungen von 1. Blutproben der Hunde IKK-9-06 und IKK-8-02 unter OD 0,2 lagen. Der Vergleich von 1. und 2. Blutprobe zeigt, dass bei den Serumproben, die initial unter OD 0,2 lagen, keine deutlich messbaren Unterschiede vor und nach der Therapie auftraten. Das Antikörperniveau blieb nahezu gleich oder veränderte sich sehr geringfügig. Bei den 15 Hunden (55,6 %), die in der ersten Blutprobe mit C6-Antikörpertitern oberhalb von OD 0,2 reagierten, zeigte sich bei 14 Hunden (93,3 %) ein messbares Sinken der C6-Antikörperspiegel nach der antibiotischen Therapie. Ein Hund (IKK-5-42) wies einen leichten Anstieg auf. Das Niveau des Absinkens war individuell sehr unterschiedlich gestaltet. Erwies sich zum Beispiel bei den Hunden IKK-9-15, IKK-9-65, IKK-50-05, IKK-50-07 und IKK-50-09 eine starke Reduktion der C6-Antikörperspiegel bei Untersuchung der 2. Blutprobe, so fiel diese bei den Hunden IKK-2-42 oder auch IKK-9-24 deutlich geringer bis kaum messbar (IKK-50-10) aus. Prozentual wurde diese Reduktion vom Ausgangswert anhand der OD-Einheiten in der Tabelle 10 dargestellt.

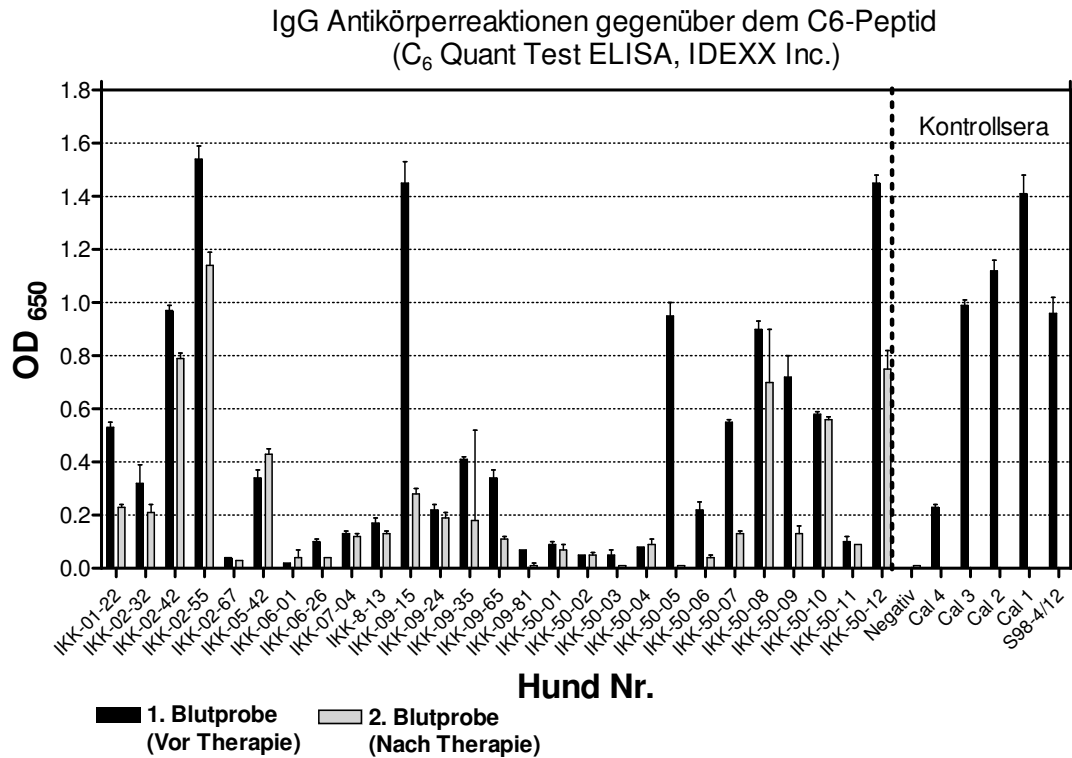


Abbildung 22: IgG-Antikörperreaktionen gegenüber dem C6-Peptid (Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-ELISA)

Negativ: negatives Kontrollserum

Cal 4: sehr niedrig-positive Kontrolle (Kalibrator 4)

Cal 3: hoch-positive Kontrolle (Kalibrator 3)

Cal 2: mittel-hoch positive Kontrolle (Kalibrator 2)

Cal 1: sehr hoch positive Kontrolle (Kalibrator 1)

S98 4/12: Kontrollserum Infektion (experimentell infizierter Hund)

#### 4.1.3.3.5 Vergleich der C6-Peptid Testergebnisse

In Tabelle 10 wurden die Ergebnisse von C6-Schnelltest und C6-ELISA der 1. und 2. Blutprobe verglichen. Es sollte festgestellt werden, ob eine Reduktion der C6-Antikörper-Reaktion mit beiden Tests nachweisbar war, obwohl laut Herstellerangaben nur der C6-ELISA dafür vorgesehen ist. Die semiquantitative Bewertung des C6-Schnelltests erfolgte um zu untersuchen, ob die Sensitivität dieses Tests ebenso ausreichen könnte, die Reduktion der C6-Antikörper nach der Therapie unter Praxisbedingungen nachzuweisen. Um die Ergebnisse des C6-ELISA besser einschätzen zu können, wurde das Sinken der Antikörpertiter (OD-Einheiten) für jeden Hund prozentual vom Ausgangswert der 1. Blutprobe errechnet. Für Sera der 1. Blutprobe, deren C6-Antikörpertiter unterhalb von OD 0,2 lag, erlaubte der sehr niedrige Wert keine deutliche Quantifizierung und das prozentuale Sinken wurde nur für die vollständige Datenerhebung dargestellt. Bei insgesamt zehn Hunden (zum Beispiel IKK-9-65, IKK-9-81 und IKK- 50-05) spiegelte sich eine verminderte C6-Antikörperreaktion nach



der Therapie in beiden C6-Testsystemen wider. Dagegen zeigte sich bei fünf Hunden die Reduktion der C6-Antikörperspiegel nur im ELISA und nicht im Schnelltest (IKK-1-22, IKK-2-55, IKK-9-15, IKK-9-35 und IKK-50-08). Bei neun Hunden, die im C6-ELISA initial unterhalb von OD 0,2 reagierten und die Unterschiede zwischen 1. und 2. Blutprobe schwer nachvollziehbar waren, erwies sich der C6-Schnelltest aber als ausreichend empfindlich, diese geringen Unterschiede auch in der Farbreaktion nachzuweisen (zum Beispiel IKK-2-67, IKK-6-26, IKK-7-04, IKK-8-13, IKK-9-81, IKK-50-01). Die prozentuale Berechnung der Reduktion der Antikörperspiegel im C6-ELISA ergab, dass bei acht Hunden (29,6 %; IKK-1-22, IKK-9-15, IKK-9-35, IKK-9-65, IKK-50-05 bis IKK-50-07 und IKK-50-09) mit initialer OD über 0,2 die Reduktion über 50,0 % betrug. Bei allen acht Hunden lag der Zeitraum zwischen Entnahme der 1. und 2. Blutprobe bei mindestens sechs Monaten bis zu 18 Monaten, keines der Tiere wurde antibiotisch vorbehandelt. Aus den Vorberichten (Tabellen E18 und E19, Anhang) dargestellte Entwicklung der klinischen Symptomatik dieser Hunde und die der C6-Antikörper im ELISA geht hervor, dass vier Hunde vor und nach Therapie keine Krankheitsanzeichen aufwiesen, bei zwei Hunden verschwanden Lahmheit oder Fieber und bei zwei Hunden zeigten sich keine Veränderungen. Der Einfluss einer prädiagnostischen Antibiose zu bestimmten Zeitpunkten vor Untersuchung der 1. Blutprobe auf die Höhe der initialen C6-Antikörpertiter konnte hier nicht detailliert untersucht werden, da die vorberichtlichen Angaben bezüglich der Zeiträume individuell sehr unterschiedlich und die Zahl untersuchter Hunde zu gering war. Die Zeiträume zwischen der antibiotischen Therapie und Untersuchung der 2. Blutprobe waren ebenfalls sehr unterschiedlich groß (4 Monate bis zu 18 Monaten). Bereits nach vier Monaten (IKK-50-12) konnte ein deutliches Absinken von C6-Antikörper beobachtet werden, während dies auch nach 5 Monaten (IKK-2-55), 6 Monaten (IKK-1-22), 9 Monaten (IKK-50-07) oder gar 18 Monaten (IKK-50-07) noch deutlich nachweisbar war.

Tabelle 10: Konnte eine Reduktion der C6-Antikörper-Reaktion bei Untersuchung der 2. Blutprobe (nach der Therapie) beobachtet werden? (\*: Die OD lag bei der 1. Blutprobe unter 0,2)

Probe	C6-Schnelltest Reduktion:	Quant C <sub>6</sub> -ELISA Reduktion: in %)**
1-22	Nein	Ja 56,6
2-32	Ja	Ja 34,4
2-42	Ja	Ja 18,6
2-55	Nein	Ja 26,0
2-67	Ja	Ja* 25,0
5-42	Ja	Nein/Anstieg - 26,5
6-01	Ja	Nein/Anstieg* -100,0
6-26	Ja	Ja* 60,0
7-04	Ja	Ja* 7,7
8-13	Ja	Ja* 23,5
9-15	Nein	Ja 80,7
9-24	Ja	Ja 13,6
9-35	Nein	Ja 56,1
9-65	Ja	Ja 67,6
9-81	Ja	Ja* 85,7
50-01	Ja	Ja* 22,2
50-02	Ja	Nein* 0,0
50-03	Ja	Ja* 80,0
50-04	Nein/Anstieg	Nein* -12,5
50-05	Ja	Ja 98,9
50-06	Ja	Ja 81,8
50-07	Ja	Ja 76,4
50-08	Nein	Ja 22,2
50-09	Ja	Ja 81,9
50-10	Ja	Ja 3,4
50-11	Ja	Ja* 10,0
50-12	Ja	Ja 48,3

\*\* Reduktion in % vom Ausgangswert

#### 4.1.3.3.6 Ergebnisse der Untersuchung mit dem speziesspezifischen C6-Peptid-ELISA

Im C6-Schnelltest positiv reagierende Sera (1. Blutprobe) wurden mit diesem ELISA getestet, um eine Aussage darüber zu erhalten, ob C6-Antikörper bei Verwendung von spezifischen C6-Peptidvarianten stark kreuzreagieren oder ob die C6-Antikörper gar so speziesspezifisch reagieren, dass eine Abschätzung möglich ist, mit welcher Borrelienart der jeweilige Hund immunologischen Kontakt hatte. Die folgend dargestellten Ergebnisse (Abbildung 23, Grafik A und B) dieses ELISAs zeigen das Vorkommen von C6-Antikörpern gegen C6-Peptide auf der Basis von *B. burgdorferi* s.s. (*BbC6*), *B. garinii* (*BgC6*) und zwei Varianten von *B. afzelii* (*BaC6-1* und *BaC6-2*). Elf Hunde reagierten nicht oder mit kaum messbaren C6-Antikörperspiegeln weit unterhalb von OD 0,2 gegenüber allen vier C6-Peptidvarianten, wie beispielsweise IKK-2-67 oder IKK-5-02. Dagegen zeigten zwei Hunde sehr starke C6-Antikörperspiegel (IKK-2-42 und IKK-2-55). Hier sind quantitativ große Unterschiede zwischen den Immunreaktionen gegen die einzelnen C6-Peptide

festzustellen. Während Hund IKK-2-42 stark (OD 0,6) auf *BgC6* und *BaC6-2* reagierte, fielen die Antikörperspiegel gegen *BbC6* und *BaC6-1* sehr niedrig aus. Hund IKK-2-55 zeigte sehr deutliche Immunreaktionen gegen *BgC6* und *BaC6-2* (OD über 1,4) und schwächere gegenüber *BbC6* und *BaC6-1*. Im mittleren Bereich unterhalb von OD 0,6 und oberhalb von OD 0,2 reagierten weitere elf Hunde mit individuell höchst unterschiedlichen Antikörperspiegeln auf die verschiedenen C6-Peptide. Lediglich zwei Sera (IKK-50-06 und IKK-50-10) reagierten generell stärker auf C6-Peptide von *B. afzelii*. Bei den anderen Sera waren die Immunreaktionen gegen *BbC6* oder auch *BgC6* stets am stärksten. Ein Hund (IKK-50-09) reagierte nahezu ausschließlich seropositiv gegenüber *BbC6*.

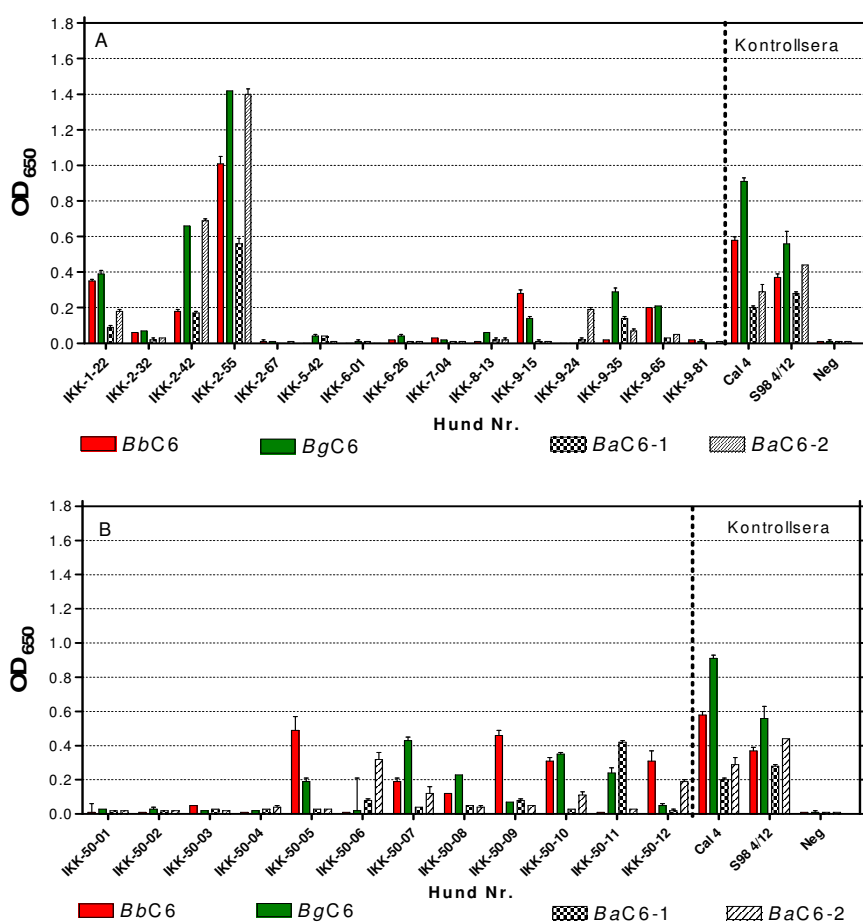


Abbildung 23: IgG-Antikörperreaktionen von Hunden (1. Blutprobe vor der antibiotischen Therapie) gegenüber verschiedenen C6-Peptiden

*BbC6* = *B. burgdorferi*-s.s.-C6-Peptid

*BgC6* = *B. garinii*-C6-Peptid

*BaC6-1* = *B. afzelii*-C6-Peptid 1

*BaC6-2* = *B. afzelii*-C6-Peptid 2

## 4.2 Ergebnisse des Infektionsversuchs

### 4.2.1 Versuche zur Borrelienanzucht

Die vergleichenden Ergebnisse des Versuchs an Tag 10 der Kultivierung finden sich im Anhang, Tabellen E21.1 bis E 21.2. Eine optimale Vitalität erreichten *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi und *B. afzelii* Slovakia in BSK-II mit 7,0 % und 8,0 % Kaninchenserum. Bei höheren Konzentrationen an Kaninchenserum nahm die Vitalität rasch ab, weshalb dort die Zellzahl auch nicht mehr beurteilt wurde. Die Vitalität in BSK-H-Medium war bei allen Spezies überwiegend mangelhaft. *B. afzelii* PKo erreichte nur in MKP-Medium eine sehr gute Vitalität, weshalb dieser Borreliens Stamm auch zukünftig ausschließlich in diesem Nährmedium kultiviert wurde. Die Ergebnisse für *B. spielmanii* zeigen eine zufriedenstellende Vitalität in BSK-II mit 7,0 % und 8,0 % Kaninchenserum, während bis auf in BSK-H mit analogen Kaninchenserumkonzentrationen keine vitalen Zellen in anderen Mediumvarianten beobachtet werden konnten. *B. lusitaniae* zeigte in vielen Varianten von BSK-II und BSK-H eine zufriedenstellende Vitalität. Deutlich wurde hier, dass die Zellen generell eine wesentlich weniger intensive Fortbewegungstendenz aufwiesen als alle anderen untersuchten Borrelienarten. Die beiden *B.-valaisiana*-Stämme zeigten die besten Ergebnisse bezüglich der Vitalität in BSK-II mit 7,0 % und 8,0 % Kaninchenserum. Unter Einbeziehung der Zellzahlen pro ml wurden folglich *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi, *B. afzelii* Slovakia, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana* Rio 6 und *B. valaisiana* VS116 in BSK-II mit 8,0 % Kaninchenserum kultiviert. Hier ist zu berücksichtigen, dass *B. spielmanii* im Vergleich zu den anderen Spezies sehr langsam wuchs ( $8,2 \times 10^5$ /ml an Tag 10).

### 4.2.2 Infektionsmodell

Die C3H/HeN-Mäuse wurden nach unter Kapitel 3.3.2.2.3 beschriebenen Methoden mit den vitalen Borrelienspezies inokuliert. Im Verlauf des Tierversuchs starb eine Maus (Maus AS02). Diese wird bei der Darstellung der Ergebnisse folgend nicht berücksichtigt.

#### 4.2.2.1 Isolierung von Borrelien aus murinen Geweben

Die den Mäusen entnommenen Organe wurden in den verschiedenen, für die Borrelienspezies optimalen Nährmedien kultiviert. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 11 (detailliert in Tabelle E22.1 bis E22.4, Anhang Tabellen). Sechs Mäuse (VS01 bis VS06) wurden mit *B. valaisiana* VS116 inokuliert. Da bereits aus einem Vorversuch bekannt war, dass dieser Stamm vermutlich nicht infektiös ist, sind die Mausorgane entsprechend der später dargestellten negativen serologischen Befunde nicht zur Isolierung von Borrelien untersucht worden. Von allen untersuchten Mäusen, die mit *B. burgdorferi* s.s. inokuliert wurden, konnten Borrelien isoliert werden (100 %). Dies betraf auch jedes der jeweiligen Organ-Gewebe. Von 20 untersuchten, mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäusen waren bei 14 Tieren einige Organkulturen positiv (70 %) insbesondere das Herz und die Blase. Ebenso wurden bei 55 % der kulturpositiven Mäuse, die mit *B. afzelii* Slovakia

inokuliert wurden, Borrelien vorwiegend in diesen Organen gefunden. Dagegen konnten aus Mäusen, die mit *B. garinii* PBi, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* oder *B. valaisiana* Rio 6 inokuliert wurden, keinerlei positive Organkulturen verzeichnet werden, obwohl diese Kulturen über zehn Wochen lang im Brutschrank belassen wurden.

Tabelle 11: Isolierung von Borrelien aus murinen Geweben (n.d. = Kultivierung nicht durchgeführt)

Spezies/ Stamm	<i>Bb</i>	<i>Bg</i> PBi	<i>Ba</i> PKo	<i>Ba</i> Slovakia	<i>Bv</i> VS 116	<i>Bv</i> Rio 6	<i>Bspi</i>	<i>Blus</i>
Anzahl der Mäuse, deren Gewebe getestet wurde/ Anzahl inokulierter Mäuse								
	12/20	18/21	20/23	20/21	0/6	8/8	18/18	24/24
Positive Gewebeproben/ Getestete Gewebeproben								
<b>Herz</b>	12/12	0/18	9/20	6/20	n.d.	0/8	0/18	0/24
<b>Blase</b>	12/12	0/18	6/20	7/20	n.d.	0/8	0/18	0/24
<b>Gelenk</b>	12/12	0/18	1/20	4/20	n.d.	0/8	0/18	0/24
<b>Ohr</b>	12/12	0/18	5/20	0/20	n.d.	0/8	0/18	0/24
<b>Rücken</b>	6/6	0/15	0/17	2/14	n.d.	0/8	0/12	0/18
Gesamtzahl <i>Borrelia</i> -positiver Mäuse								
<b>Mäuse</b>	12/12	0/18	14/20	11/20	n.d.	0/8	0/18	0/24
<b>(%)</b>	100	0	70	55		0	0	0

## 4.2.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

### 4.2.3.1 Untersuchungen mittels Lysat-Antigen (Zweistufentest)

#### 4.2.3.1.1 KELA

In Abbildung 24 mit den Grafiken A bis G sind die Ergebnisse für jede Mausgruppe an den Tagen 28 und 56 p.i. dargestellt. Starke und zunehmende Antikörper-Reaktionen gegenüber Borrelienantigenen zeigten alle Mäuse, die mit *B. burgdorferi* s.s. N40 (Grafik A), *B. afzelii* PKo (Grafik C) und *B. afzelii* Slovakia (Grafik D) inokuliert wurden. Die mit *B.-garinii*-inokulierten Mäuse (Grafik B) dagegen reagierten individuell sehr unterschiedlich. Während sieben Mäuse seronegativ blieben (G02, G04, G15 - G17, G19 und G20), zeigten acht Mäuse moderate Serokonversion (G03, G05, G06, G08, G11, G12, G18 und G21). Drei Mäuse (G01, G07 und G10) bildeten hohe Antikörperreaktionen aus. Diese starken individuellen Unterschiede zeigten sich auch bei Mäusen, die mit *B. spielmanii* inokuliert wurden (Grafik G). Sechs Mäuse (S07, S09 - S12 und S17) bildeten schwache Antikörperreaktionen aus, die teils nicht den Cut-off überschritten, während die restlichen zwölf Mäuse dagegen einen deutlich höheren Anstieg der Antikörperspiegel zeigten. Nur zwei von 24 untersuchten Mäusen, die mit *B. lusitaniae* inokuliert wurden (Grafik F), reagierten seropositiv (L01 und L04). Keine der Mäuse, die mit einem der *B.-valaisiana*-Stämme inokuliert wurden, wies indes eine deutliche Serokonversion auf (Grafik E). Die Sera von Tag 84 p.i. zeigten jeweils keine deutlich unterschiedlichen Werte gegenüber Tag 56 p.i. und wurden hier deshalb nicht dargestellt.

## IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber *B. burgdorferi sensu stricto* Lysat-Antigen

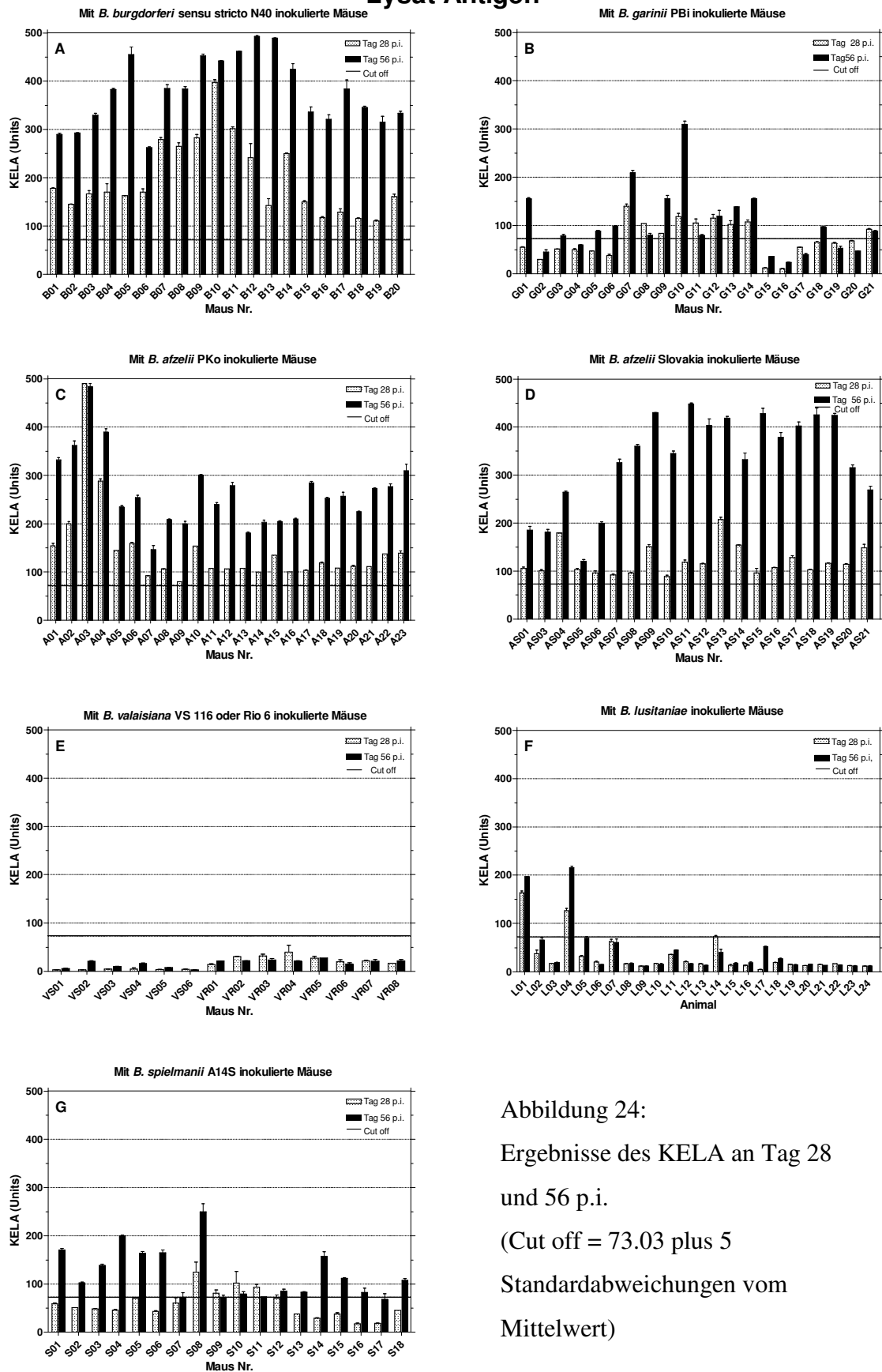


Abbildung 24:

Ergebnisse des KELA an Tag 28  
und 56 p.i.  
(Cut off = 73.03 plus 5  
Standardabweichungen vom  
Mittelwert)

#### 4.2.3.1.2 Untersuchungen mit dem kommerziellen Western-Blot

Im Anhang (Abbildungen A5 bis A9) sind die Ergebnisse für Immunreaktionen einzelner Maussera gegenüber *B. burgdorferi* s.s. N40 (A5), *B. garinii* PBi (A6), *B. afzelii* PKo (A7), *B. afzelii* Slovakia (A8) und *B. spielmanii* (A9) dargestellt. Da die Ergebnisse für alle Mäuse, die mit *B. lusitaniae* sowie *B. valaisiana* inokuliert wurden negativ ausfielen, sind in Abbildung 25 nur ausgewählte Sera dieser Mausgruppen in der Übersicht mit jeweils drei Teststreifen dargestellt. Die quantitativen Verhältnisse der Reaktionen gegenüber den verschiedenen Proteinbanden wurden in Tabelle 12 ausgewertet. Zwischen den Mausgruppen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Immunreaktionen gegenüber den verschiedenen Borrelien-Proteinen. Während alle mit *B.-burgdorferi*--s.s.-N40- und *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäuse seropositiv gegenüber VlsE reagierten, betrug dieser Anteil bei den mit *B.-afzelii*-Slovakia- inokulierten Mäusen 85,0 % (17 von 20 Mäusen) und bei mit *B.-spielmanii*-inokulierten Mäusen 94,4 % (17 von 18 Mäusen). Nur drei von 20 untersuchten Mäusen (15,0 %), die mit *B. garinii* PBi inokuliert wurden, zeigten Serumreaktionen gegenüber VlsE. Diese drei Sera sind in Abbildung 25 (Nr. 2a bis c) abgebildet. Die Intensität der VlsE-Farbreaktion war hier gegenüber denen der anderen Mausgruppen deutlich schwächer ausgeprägt. Die Intensität und Ausprägung der Reaktion gegen Lysat-Antigen-Proteine waren bei mit *B.-afzelii*-PKo und *B.-afzelii* Slovakia-inokulierten Mäusen sehr ähnlich (Abbildungen 25, A7 und A8). Intensiv waren Antikörper-Reaktionen gegenüber p83/100, p41, OspC und p21 (jeweils 100,0 %; Tabelle 12). Mäuse, die mit *B. burgdorferi* s.s. N40 (Abbildungen 25 1a bis c und Abbildung A5) inokuliert wurden, reagierten mit deutlich weniger stark gefärbten Banden gegenüber p83/100 oder ohne Signale, was auch mit sehr individuell unterschiedlichen Farbintensitäten für p41 (95,0 %), p39 (70,0 %), OspC (80,0 %) und p21 (70,0 %) zu beobachten war. Mit *B.-garinii*-PBi-inokulierte Tiere reagierten nur in einem Fall gegenüber p83/100, aber ein großer Teil der Mäuse gegenüber OspC (90,0 %) und p21 (65,0 %) (abbildung A6). Nur wenige Sera von mit *B.-spielmanii*-inokulierten Mäusen (Abbildung A9) zeigten Reaktionen gegenüber OspC (16,7 %), aber deutliche Serumreaktionen gegenüber OspA (44,4 %). Unterschiedlich stark ausgeprägt waren Reaktionen gegen p39 (66,7 %), p41 (88,9 %) und p83/100 (77,8 %). Für alle untersuchten murinen Sera erschien die Einordnung von Reaktionen gegenüber p30 und p58 in positiv oder negativ schwierig, da hier zum Teil sehr unscharfe und schwache Farbreaktionen auftraten, die ebenso auf der Auswertungsschablone des Testkits sehr schwach ausgeprägt waren. Am deutlichsten zeigten sich Reaktionen gegenüber p30 bei Mäusen, die mit *B. burgdorferi* s.s. N40 inokuliert wurden, wie zum Beispiel bei Maus B01 und B06 in Abbildung A5.

Tabelle 12: Ergebnisse des Western Blots mit murinen Sera (Tag 56 p.i.)

Inokulierte Borrellien	Bbss N40	Bg PBi	Ba PKo	Ba Slovakia	Bsp A14S	BI	Bv VS116	Bv Rio 6
Getestet (Anzahl / %)	20 100,0	20 100,0	23 100,0	20 100,0	18 100,0	24 100,0	6 100,0	8 100,0
Proteinbanden (Anzahl / % der getesteten Sera)								
VisE	20 100,0	3 15,0	23 100,0	17 85,0	17 94,4	0 0,0	0 0,0	0 0,0
p83/p100	15 75,0	1 5,0	23 100,0	20 100,0	14 77,8	0 0,0	0 0,0	0 0,0
p58	7 35,0	1 5,0	18 78,3	11 55,0	3 16,7	0 0,0	0 0,0	0 0,0
p43	0 0,0	0 0,0	1 4,3	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
p41	19 95,0	13 65,0	23 100,0	20 100,0	16 88,9	1 4,2	0 0,0	0 0,0
p39	14 70,0	4 20,0	23 100,0	17 85,0	12 66,7	0 0,0	0 0,0	0 0,0
OspA	1 5,0	4 20,0	0 0,0	4 20,0	8 44,4	7 29,2	0 0,0	0 0,0
p30	6 30,0	0 0,0	2 8,7	3 15,0	3 16,7	0 0,0	0 0,0	0 0,0
OspC	16 80,0	18 90,0	23 100,0	20 100,0	3 16,7	0 0,0	0 0,0	0 0,0
p21	14 70,0	13 65,0	23 100,0	20 100,0	13 72,2	0 0,0	0 0,0	0 0,0
p17	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0



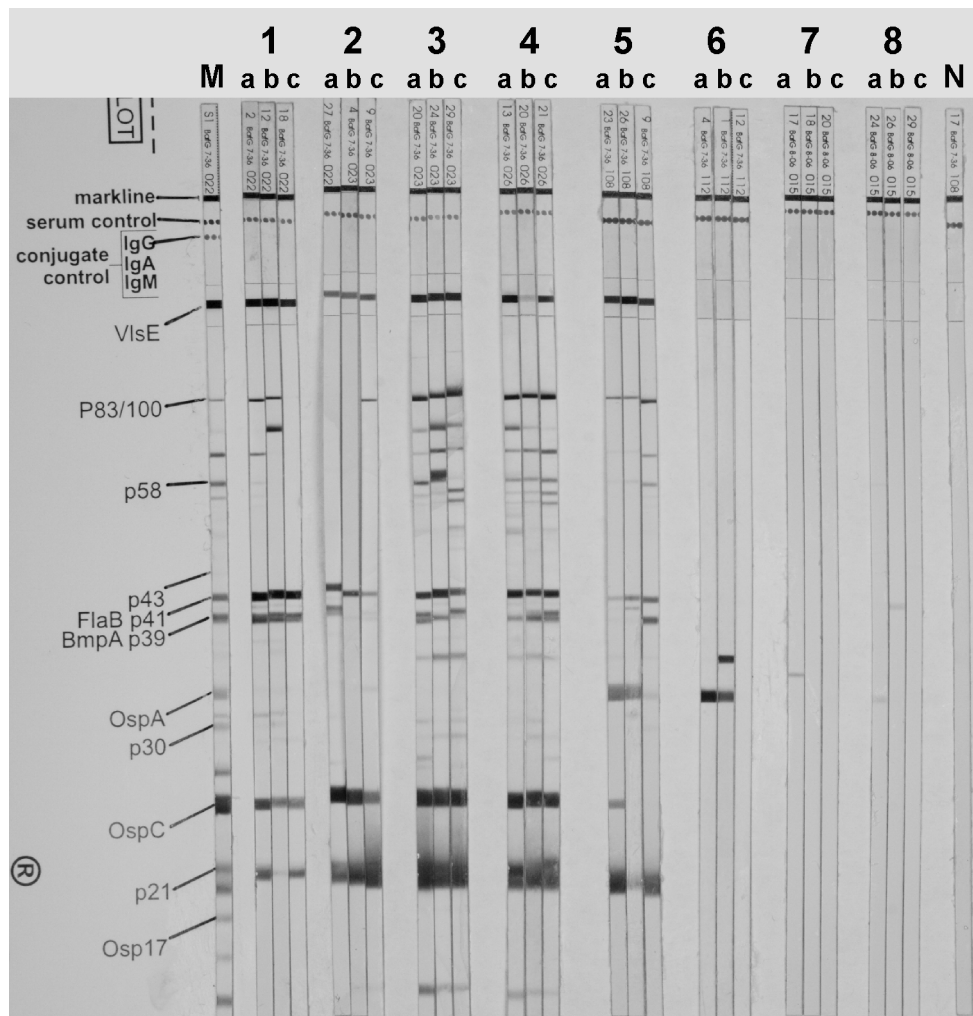


Abbildung 25: IgG-Antikörper-Reaktionen muriner Sera gegenüber rekombinantem VlsE und *B. afzelii*-Lysat-Antigen Tag 56 p.i.

M : Kontroll-Schablone für Proteinbanden

N : Negatives Kontrollserum (C3H/HeN nicht inokuliert)

Nr.1, Streifen a - c: Mit *B. burgdorferi* s.s. N40 inokulierte Mäuse (B02, B12, B19)

Nr.2, Streifen a - c: Mit *B. garinii* PBi inokulierte Mäuse (G07, G13, G18)

Nr.3, Streifen a - c: Mit *B. afzelii* PKo inokulierte Mäuse (A08, A12, A17)

Nr.4, Streifen a - c: Mit *B. afzelii* Slovakia inokulierte Mäuse (AS07, AS14, AS15)

Nr.5, Streifen a - c: Mit *B. spielmanii* inokulierte Mäuse (S09, S22, S25)

Nr.6, Streifen a - c: Mit *B. lusitaniae* inokulierte Mäuse (L04, L01, L12)

Nr.7, Streifen a - c: Mit *B. valaisiana* VS116 inokulierte Mäuse (VS02, VS03, VS05)

Nr.8, Streifen a - c: Mit *B. valaisiana* Rio 6 inokulierte Mäuse (VR03, VR05, VR08)

#### **4.2.3.1.3 Interpretation der Ergebnisse des Zweistufentests**

Der KELA wurden als positiv bewertet, sofern der Antikörperspiegel an Tag 56 oberhalb des Cut-offs lag. Entscheidend war abschließend das detaillierte Ergebnis des Western-Blots. Entsprechend wurden alle mit *B.-burgdorferi*-s.s.-N40-inokulierten Mäuse (B01 bis B20) als seropositiv für eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. N40 bewertet, dies galt auch für entsprechende infektionsspezifische Reaktionen aller mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäuse. Im Falle von mit *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierten Mäusen wurden 17 Tiere als seropositiv beurteilt, da drei Mäuse (AS11, AS14 und AS20) sehr schwache Reaktionen gegenüber VlsE (Abbildung A8) trotz der deutlich ausgeprägten Reaktionen gegenüber allen anderen Lysatproteinen zeigten. Nur drei Mäuse von 21, die mit *B. garinii* PBi inokuliert wurden, konnten als bewertet werden (G07, G13 und G18), da zwar auch bei anderen KELA-positiven Mäusen infektionsspezifische Banden wie OspC oder p21 auftraten, aber Serumreaktionen gegenüber VlsE völlig fehlten. Dagegen wurden alle 17 VlsE-positiven Sera von mit *B.-spielmanii*-inokulierten Mäusen als seropositiv gewertet. Auf Grund der insgesamt schwachen Immunreaktionen bei den mit *B.-valaisiana*- und *B.-lusitaniae*-inokulierten Mäusen (Auswahl in Abbildung 25) wurden alle diese Tiere unter Einbeziehung der KELA-Daten als seronegativ bewertet. Keines der Sera reagierte gegenüber rekombinantem VlsE, Immunreaktionen gegenüber Lysat-Antigen waren nur im Falle von OspA und p41 bei einigen mit *B.-lusitaniae*-inokulierten Mäusen zu beobachten.

#### **4.2.3.2 Untersuchungen mittels des C6-Peptids**

Die Immunreaktionen gegenüber dem C6-Peptid wurden mittels Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-ELISA überprüft. Damit sollte die Entwicklung der Antikörperreaktionen im Verlauf der potenziellen Infektion (Tag 28 und 56 p.i. verfolgt werden. Des Weiteren sollte eine Vergleichsmöglichkeit zu dem C6-ELISA geschaffen werden, der je vier speziesspezifische C6-Peptidsequenzen beinhaltet. Zusätzlich sind die Mittelwerte  $\overline{X}$  und Standardabweichungen  $\sigma$  der pro Gruppe untersuchten Sera von Tag 56 p.i. errechnet worden. Die für Tag 84 p.i. untersuchten Sera werden nicht gezeigt, da keine zusätzlichen, weiterführenden Informationen bezüglich der Antikörpertiter-Höhe ermittelt wurden.

##### **4.2.3.2.1 Kommerzieller C6-ELISA (Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-ELISA)**

Die Daten für die an Tag 28 und 56 p.i. gewonnenen Maussera sind in Abbildung 26 Grafik A bis G dargestellt. Mit *B. burgdorferi* s.s. N40 inokulierte Mäuse (Grafik A) bildeten starke und im zeitlichen Verlauf überwiegend ansteigende IgG-Antikörperreaktionen ( $\text{OD } \overline{X} = 1,7$ ;  $\sigma = 0,56$  an Tag 56 p.i.) aus. Fünf Mäuse (B15-B19) zeigten etwas niedrigere Antikörper-Reaktionen. Mit *B.-afzelii*-PKo -inokulierte Mäuse (Grafik C) entwickelten im Vergleich schwächere Reaktionen gegenüber dem C6-Peptid ( $\text{OD } \overline{X} = 0,65$ ;  $\sigma = 0,36$  an Tag 56 p.i.). Dreizehn dieser Tiere (A01-A04, A07, A10, A11, A15- A18, A20 und A22) zeigten ein Absinken der Antikörperspiegel von Tag 28 zu 56 p.i. Ebenso konnte dies deutlich bei sechs (AS04, AS05, AS08, AS09, AS12 und AS14) mit *B.-afzelii*-Slovakia (Grafik D)-inokulierten Mäusen beobachtet werden. Es wurden im Durchschnitt

moderate ( $\overline{OD\ X} = 0,35$ ;  $\sigma = 0,33$  an Tag 56 p.i.) Serumreaktionen gemessen. Nur drei der mit *B. garinii*-PBi-inokulierten Mäuse (Grafik B) zeigten deutliche Immunreaktionen (G07, G13 und G18), die durchschnittliche Werte von  $\overline{X} = 0,49$  und  $\sigma = 0,40$  an Tag 56 p.i. ausbildeten, wohingegen die anderen Mäuse dieser Gruppe kein Ansteigen der Antikörperspiegel über den Cut-off zeigten. In Grafik G sind sechs mit *B. spielmanii*-A14S-inokulierte Mäuse zu erkennen, deren Sera schwach zunehmende Antikörper-Reaktionen im Verlauf der Zeit entwickelten (S01, S04, S06, S07, S17 und S18). Insgesamt bewegten sich die durchschnittlichen Werte dieser Mausgruppe auf einem sehr niedrigen Niveau ( $\overline{X} = 0,13$  und  $\sigma = 0,18$  an Tag 56 p.i.). Mäuse, die mit einem der beiden *B. valaisiana*-Stämme inokuliert wurden, sind in Grafik E abgebildet ( $\overline{X} = 0,04$ ,  $\sigma = 0,0$  an Tag 56 p.i.). Sie zeigten ebenso wie alle der mit *B. lusitaniae*-inokulierten Mäuse in Grafik F ( $\overline{X} = 0,02$  und  $\sigma = 0,02$  an Tag 56 p.i.) keine messbaren Antikörper-Reaktionen gegenüber dem C6-Peptid.

#### 4.2.3.2.2 ELISA mit speziesspezifischen C6-Peptiden

Immunreaktionen gegenüber *BbC6* sind in Abbildung 27 dargestellt, gegenüber *BgC6* in Abbildung 28 und gegen die beiden *Ba*-basierten C6-Peptide in Abbildung 29 (*BaC6-1*) und 30 (*BaC6-2*). Die Untersuchung erfolgte nur mit Sera von Tag 56 p.i., da möglichst gut etablierte C6-Antikörperspiegel erfasst werden sollten. Bei Betrachtung der Antikörper-Reaktionen von mit *B. burgdorferi*-s.s.-N40--inokulierten Mäusen gegenüber den vier C6-Peptidvarianten (Abbildung 27 bis 30, jeweils Grafik A) zeigt sich, dass deren Sera deutlich, wenn auch mit unterschiedlichen Intensitäten reagierten. Die quantitativ höchsten durchschnittlichen Werte wurden gegenüber *BgC6* ( $\overline{X} = 1,5$ ;  $\sigma = 0,43$ ) detektiert, gefolgt von *BbC6* ( $\overline{X} = 1,33$ ;  $\sigma = 0,17$ ). Dagegen zeigten sich deutlich niedrigere und von Maus zu Maus unterschiedlichere Antikörper-Reaktionen, wenn die zwei auf *B. afzelii* zurückgehenden C6-Peptide *BaC6-1* ( $\overline{X} = 0,59$ ;  $\sigma = 0,10$ ) und *BaC6-2* ( $\overline{X} = 0,49$ ;  $\sigma = 0,66$ ) verwendet wurden. Zwölf der untersuchten Maussera (Abbildung 29 Grafik A) beziehungsweise sieben Sera (Abbildung 30, Grafik A) überragten hier nicht den Schwellenwert (Cut-off). Dagegen zeigten einzelne murine Sera (B02, B04, B06, B07, B12, B13, B15 und B19 in Abbildung 29, Grafik A; sowie B02, B04 bis B07, B12, B13, B15, B17 bis B19 in Abbildung 30, Grafik A) deutlich stärkere Antikörper-Reaktionen gegenüber *Ba*-C6-Peptiden.

## IgG Antikörper- Reaktionen gegenüber dem Quant C<sub>6</sub> ELISA

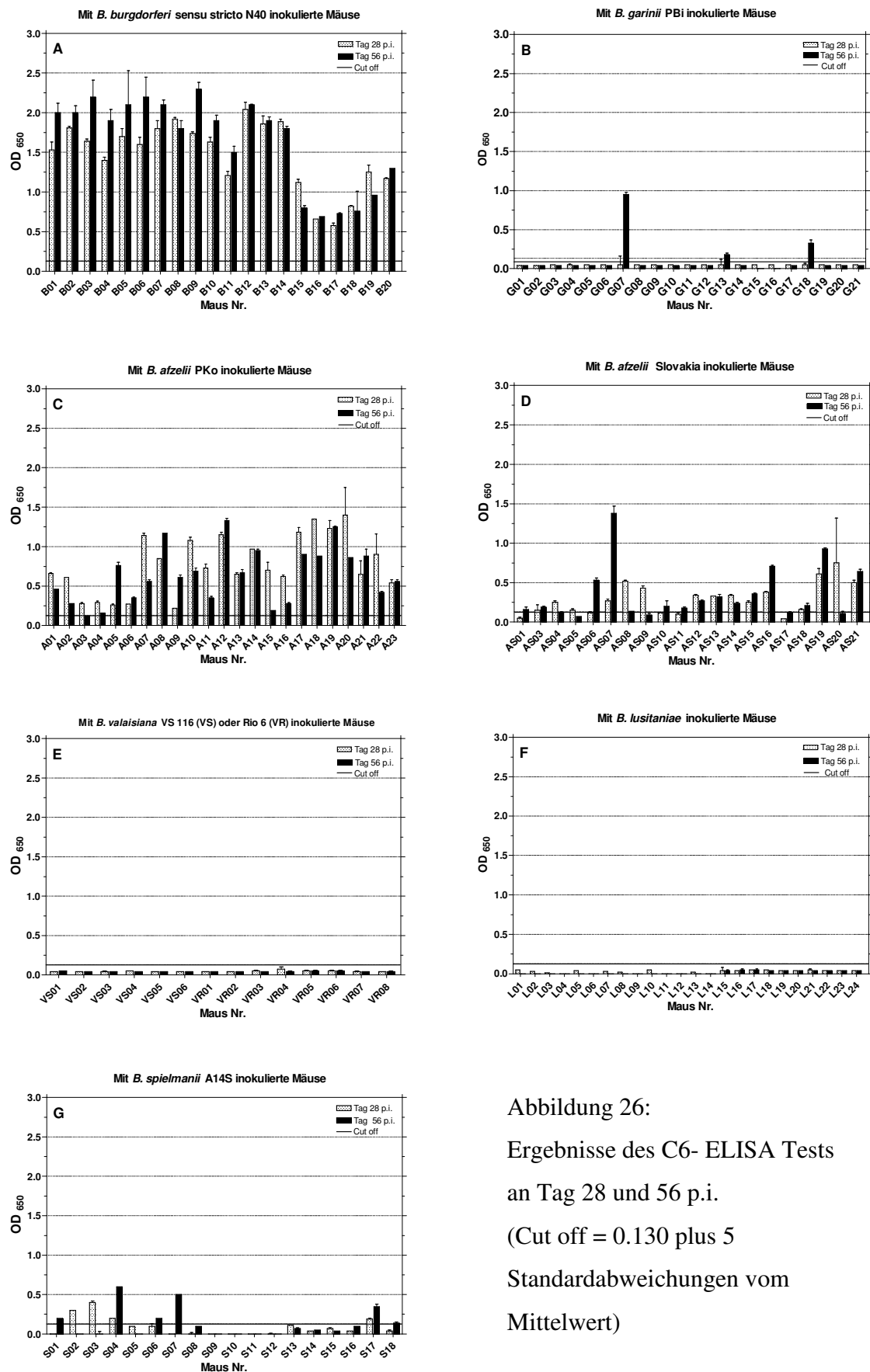


Abbildung 26:

Ergebnisse des C<sub>6</sub>- ELISA Tests

an Tag 28 und 56 p.i.

(Cut off = 0.130 plus 5

Standardabweichungen vom

Mittelwert)

Demgegenüber bildeten Mäuse, die mit *B. afzelii* PKo inokuliert wurden, (Abbildung 27 bis 30, je Grafik C) die höchsten Antikörper-Reaktionen gegen die *B.-afzelii*-C6-Peptide BaC6-1 ( $\bar{X} = 1,40$ ;  $\sigma = 0,55$ ) und BaC6-2 ( $\bar{X} = 1,60$ ;  $\sigma = 0,57$ ). Immunreaktionen gegenüber BbC6 ( $\bar{X} = 0,98$ ;  $\sigma = 0,65$ ; Abbildung 27, Grafik C) variierten deutlich zwischen den einzelnen Tieren. Die schwächsten durchschnittlichen C6-Antikörper-Reaktionen wurden mittels des BgC6 –Peptids ermittelt ( $\bar{X} = 0,71$ ;  $\sigma = 0,60$ ). Mäuse, die mit *B. afzelii* Slovakia inokuliert wurden, (Abbildung 27 bis 30, Grafik D) reagierten am stärksten gegenüber BaC6-1 ( $\bar{X} = 0,50$ ;  $\sigma = 0,52$ ) gefolgt von C6-Peptid BaC6-2 ( $\bar{X} = 0,27$ ;  $\sigma = 0,36$ ). Gegenüber dem BgC6-Peptid (Abbildung 28, Grafik D) erreichten hier nur vier murine Sera moderate Antikörperspiegel (AS03, AS06, AS07 und AS19), wobei der Mittelwert ( $\bar{X} = 0,16$ ;  $\sigma = 0,20$ ) entsprechend niedrig lag. Insgesamt zeigt sich, dass die Antikörper von mit *B.-afzelii*-Slovakia inokulierten Mäusen deutlich schwächer auf die verschiedenen C6-Peptide reagierten als Sera der mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäuse. Von der Gruppe mit *B.-garinii*-PBi-inokulierten Mäusen wiesen drei (G07, G13 und G18 in Abbildung 28 Grafik B) messbare Werte gegenüber BgC6 ( $\bar{X} = 0,10$ ;  $\sigma = 0,36$ ) auf. Ähnlich liegt die Verteilung der Antikörperreaktionen auch gegenüber BbC6 in Abbildung 27, Grafik B, allerdings liegt der Mittelwert hier deutlich niedriger ( $\bar{X} = 0,06$ ;  $\sigma = 0,12$ ). Nun das Serum der Maus G13 überschritt den Cut-off, wenn Antikörper gegen BaC6-2 ( $\bar{X} = 0,04$ ;  $\sigma = 0,05$ ) gemessen wurden (Abbildung 30, Grafik B). Keinerlei Antikörperreaktionen oberhalb des Cut-offs konnten dagegen mit BaC6-1 ( $\bar{X} = 0,02$ ;  $\sigma = 0,04$ ) ermittelt werden. Betrachtet man Mäuse, die mit *B. spielmanii* inokuliert wurden (Abbildungen 27 bis 30, je Grafik G), so zeigten sich sehr schwache Antikörper-Reaktionen gegen die C6-Peptidvarianten. Die höchsten Werte wurden unter Verwendung von BbC6 (Abbildung 27, Grafik G) mit durchschnittlich  $\bar{X} = 0,09$  und  $\sigma = 0,07$  erreicht. Neun Sera entwickelten messbare Reaktionen unterhalb von OD 0,25 (S01, S03 bis S06, S08, S14, S15 und S17). Dagegen zeigten fünf Sera (S01, S03, S04, S13 und S18) sehr schwache Reaktionen oberhalb des Cut-offs gegenüber BgC6 (Abbildung 28) und von 18 Sera durchschnittlich  $\bar{X} = 0,03$  und  $\sigma = 0,03$ . Zwei Sera (S02 und S06) überschritten den Cut-off mit Antikörper-Reaktionen gegenüber BaC6-2 (Abbildung 30) deutlicher, während S07 und S18 auf BaC6-1 (Abbildung 29) reagierten. Keine Antikörper-Reaktionen gegen BbC6, BgC6 oder BaC6-1 und BaC6-2-Peptide konnten bei Mäusen gemessen werden, die mit *B. valaisiana* oder *B. lusitaniae* inokuliert wurden (Abbildungen 27 bis 30, Grafiken E und F).

## IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber *B. burgdorferi sensu stricto* C6 - Peptid

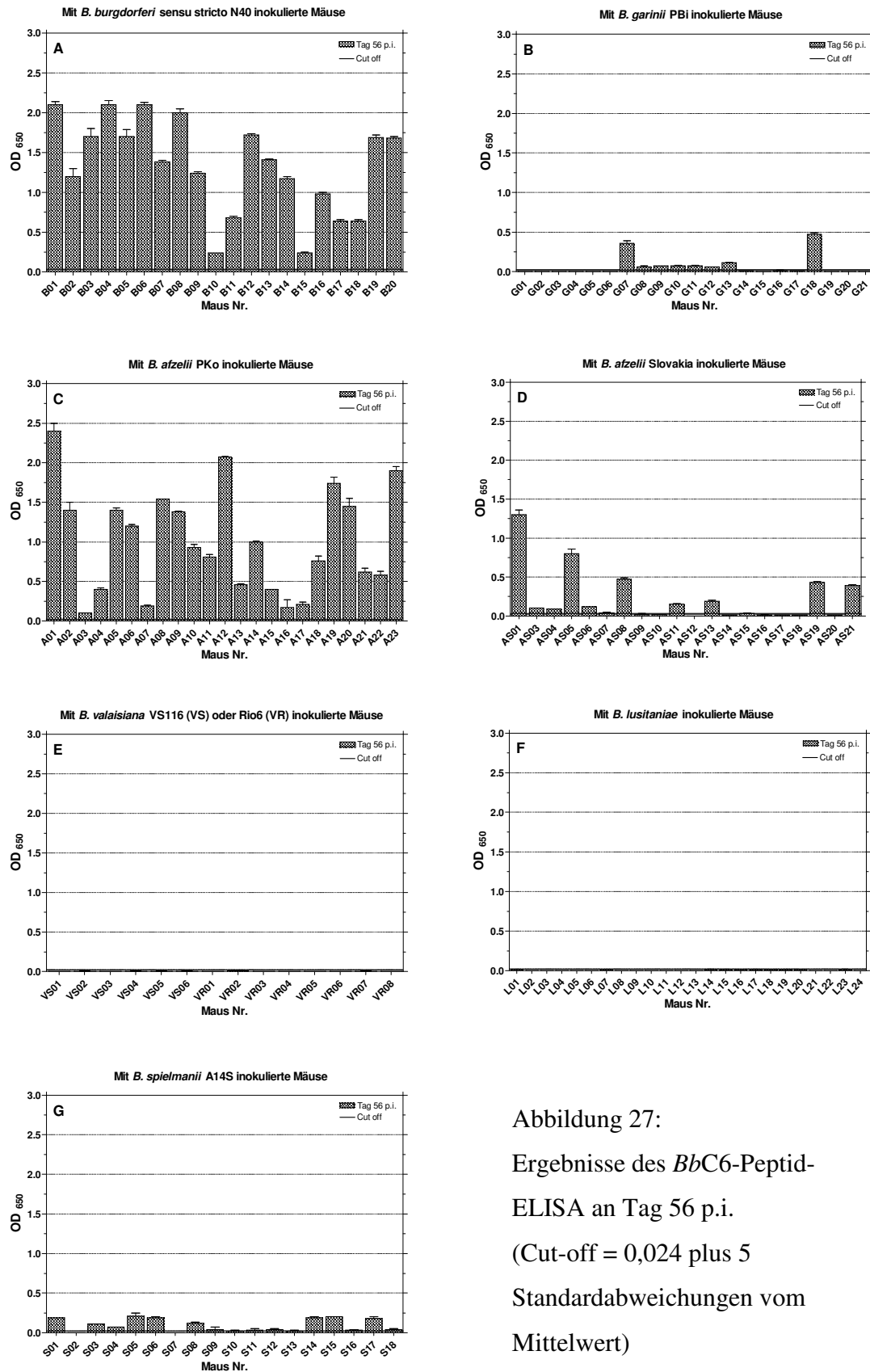


Abbildung 27:  
Ergebnisse des BbC6-Peptid-  
ELISA an Tag 56 p.i.  
(Cut-off = 0,024 plus 5  
Standardabweichungen vom  
Mittelwert)

## IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber *B. garinii* C6 - Peptid

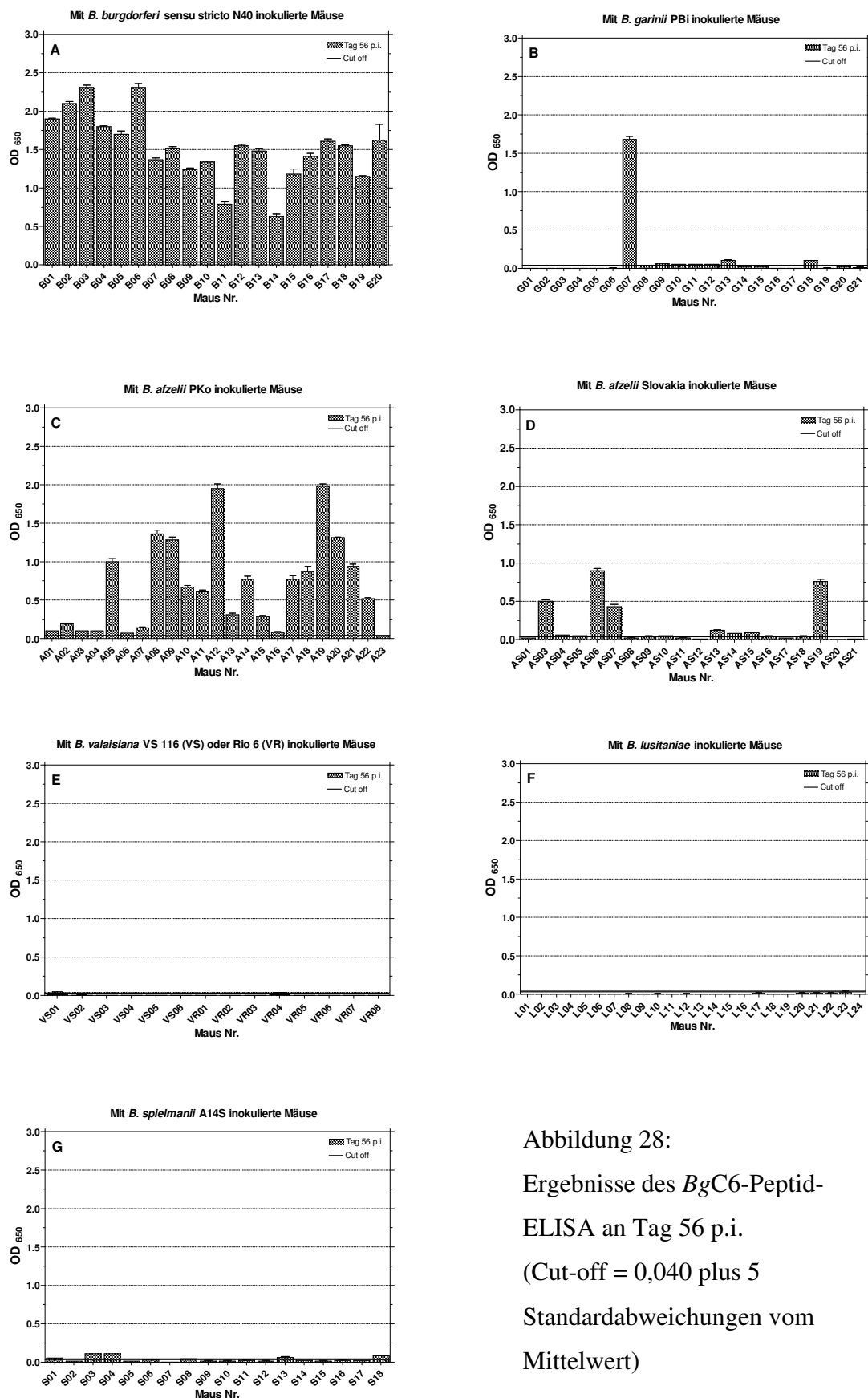


Abbildung 28:

Ergebnisse des *BgC6*-Peptid-

ELISA an Tag 56 p.i.

(Cut-off = 0,040 plus 5

Standardabweichungen vom

Mittelwert)

## IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber *B. afzelii* C6-Peptid 1

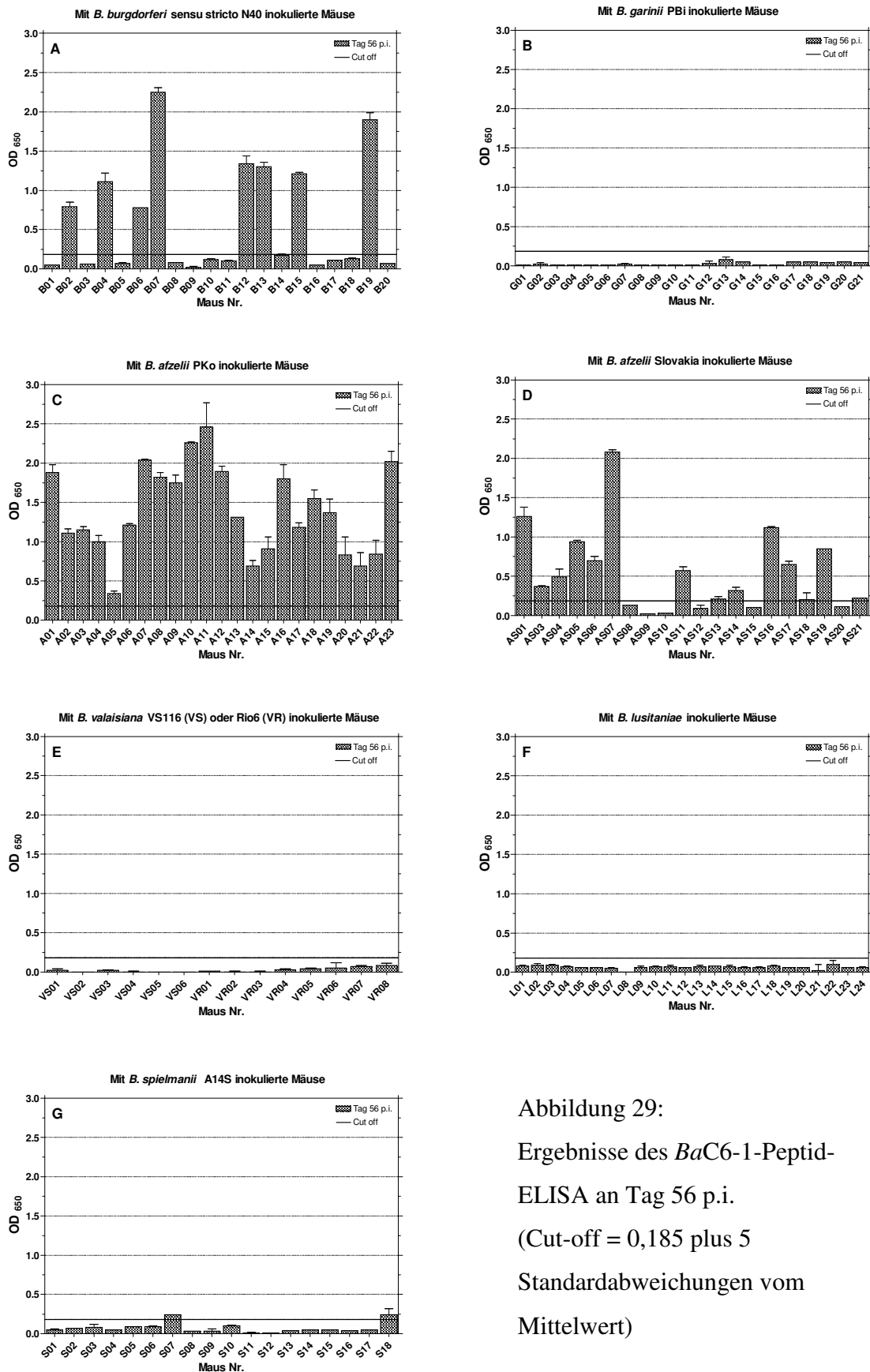


Abbildung 29:

Ergebnisse des *BaC6-1*-Peptid-

ELISA an Tag 56 p.i.

(Cut-off = 0,185 plus 5

Standardabweichungen vom

Mittelwert)



## IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber *B. afzelii* C6-Peptid 2

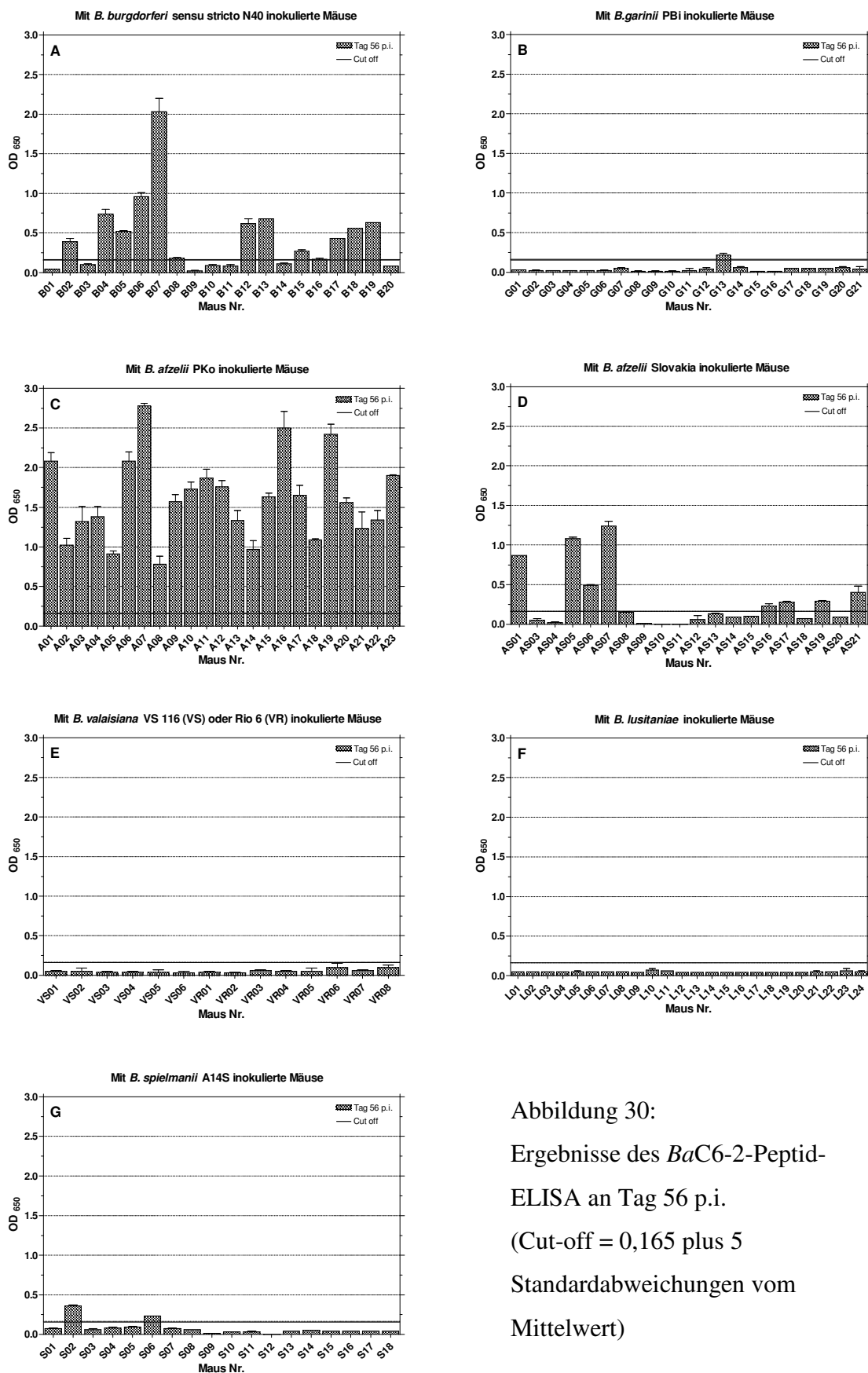


Abbildung 30:  
Ergebnisse des *BaC6-2*-Peptid-  
ELISA an Tag 56 p.i.  
(Cut-off = 0,165 plus 5  
Standardabweichungen vom  
Mittelwert)

#### 4.2.3.3 Vergleich der Sensitivitäten der verschiedenen C6-Peptide

Die Ergebnisse des Zweistufentests (KELA und Western-Blot), als Standardmethode für die serologische Diagnostik stellten die richtig-positiven und richtig-negativen serologischen Testergebnisse für die Maussera dar. Auf dieser Basis wurden die Sensitivitäten der einzelnen C6-Peptide untereinander verglichen. So konnte eine Aussage über die Sensitivität der C6-Peptide untereinander und gegenüber dem Zweistufentestsystem ermöglicht werden. Die Berechnung der Sensitivität erfolgte für jedes C6-Peptid nach folgender Formel:

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{N Richtig - Positive}}{(\text{N Richtig - Positive} + \text{N Falsch - Positive})} \times 100$$

Die zusammengefassten Testergebnisse und Berechnungsgrundlagen sind im Anhang Tabellen, Tabelle E23 aufgeführt. Die Gruppen der mit *B. lusitaniae*- und *B. valaisiana*-inokulierten Mäuse wurden nicht berücksichtigt, da sie in allen bisherigen Tests als seronegativ eingestuft wurden und keine C6-spezifischen Antikörperreaktionen zeigten. Die errechneten Sensitivitäten sind zusammenfassend in Tabelle 13 abgebildet. Mit den C6-Peptiden auf der Basis von *B. burgdorferi* s.s. und *B. garini* konnten im homologen Testsystem, also der Detektion von jeweils *B.-burgdorferi*-s.s.- und *B.-garinii*-spezifischen C6-Antikörpern Sensitivitäten von 100,0 % erreicht werden, aber auch 100 %ige Kreuzreaktivitäten zwischen diesen zwei Spezies. Ebenfalls zufriedenstellend waren die Sensitivitäten der Detektion von *BaC6*-Antikörpern des Stammes PKo mit 100,0 % für *BbC6* und 95,7 % für *BgC6*. Dagegen zeigten sich gegenüber dem zweiten *B.-afzelii*-Stamm, *B. afzelii* Slovakia deutliche Sensitivitätsverluste von 58,8 % bei der Verwendung von *BbC6* und 64,7 % bei Verwendung von *BgC6*. Auch im homologen Testsystem konnten hier nur Sensitivitäten von maximal 70,6 % bei Verwendung von *BaC6*-1 und nur noch 47,1 % bei Verwendung von *BaC6*-2 erreicht werden. Beide *B.-afzelii*-C6-Peptide detektierten aber murine, infektionsspezifische C6-Antikörper gegen *B. afzelii* PKo in vollem Umfang mit Sensitivitäten von je 100,0 %. Mit *BaC6*-1 konnten keine C6-Antikörper gegen *B. garinii* PBi erfasst werden, und nur 33,3 % der seropositiven Mäuse (n = 1) mittels *BaC6*-2. Insgesamt 40,0 % aller *B. burgdorferi* s.s. N40-seropositiven Mäuse wurden mit *BaC6*-1 detektiert und 65,0 % mit *BaC6*-2. C6-Antikörper gegen *B. spielmanii* wurden schlecht erfasst, wobei die höchste Sensitivität von 52,9 % mit *BbC6*, die niedrigste mit je 11,8 % durch beide *B.-afzelii*-C6-Peptide erreicht wurde.

Tabelle 13: Sensitivitäten der verschiedenen C6-Peptide

C6-Serumantikörper gegen Borrelien	Sensitivität der speziesspezifischen C6-Peptide in %			
	<i>BbC6</i>	<i>BgC6</i>	<i>BaC6-1</i>	<i>BaC6-2</i>
<i>B. burgdorferi</i> s.s. N40	100,0	100,0	40,0	65,0
<i>B. garinii</i> PBi	100,0	100,0	0,0	33,3
<i>B. afzelii</i> PKo	100,0	95,7	100,0	100,0
<i>B. afzelii</i> Slovakia	58,8	64,7	70,6	47,1
<i>B. spielmanii</i> A14S	52,9	23,5	11,8	11,8

#### 4.2.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

##### 4.2.4.1 PCR zur Ermittlung des Vorhandenseins von *lp25* und *lp28-1* in Borrelien

Um das Infektions- und Persistenzpotenzial der Borrelienspezies- und -Stämme im murinen Wirt zu untersuchen, wurde eine PCR durchgeführt, die die DNA der linearen Plasmide *lp25* und *lp28-1* detektiert. Die Ergebnisse für jede der inokulierten Borrelienarten sind in Abbildung 31 anhand zweier gefärbter Agarose-Gele dargestellt. Sofern vorhanden, wurden sowohl die in die Maus inokulierte Borrelienpassage sowie das später aus Geweben gewonnene Isolat untersucht. In Gel A ist zu erkennen, dass alle hier untersuchten Borrelien außer *B. valaisiana* VS116 (Nr. 5a) und *B. valaisiana* Rio 6 (Nr. 6a) *lp25*-DNA enthalten. Bezüglich *B. valaisiana* Rio 6 (6a) wurde ein schwaches, unspezifisches DNA-Produkt bei einer Größe von ca. 600 bp gebildet. Die DNA von *lp28-1* (Gel B) wurde in allen untersuchten Spezies und Stämmen gefunden, mit Ausnahme von *B. lusitaniae* (Nr. 8a), *B. valaisiana* VS116 (Nr. 5a) und *B. valaisiana* Rio 6 (Nr. 6a). Im Falle dieser beiden *B.-valaisiana*-Stämme wurden Produkte mit geringerer Größe (etwa 270 bp) festgestellt. Diese Daten zeigen, dass die beiden Stämme von *B. valaisiana* vermutlich kein nachhaltiges Infektionspotenzial aufweisen und dass es im Falle von *B. lusitaniae* durch das Fehlen von *lp28-1* wahrscheinlich deutlich eingeschränkt ist. Die bisher erhobenen Daten der Gewebekultur, aber auch die serologischen Daten belegen dies durch das Fehlen von infektionsspezifischen Immunreaktionen bei Mäusen, die mit diesen Spezies und Stämmen inokuliert wurden. Besonders ist das Fehlen von Antikörper gegen VlsE im Western-Blot dieser Mäuse hervorzuheben, da das zu Grunde liegende Gen *vls* des Proteinproduktes VlsE durch *lp28-1* encodiert wird.

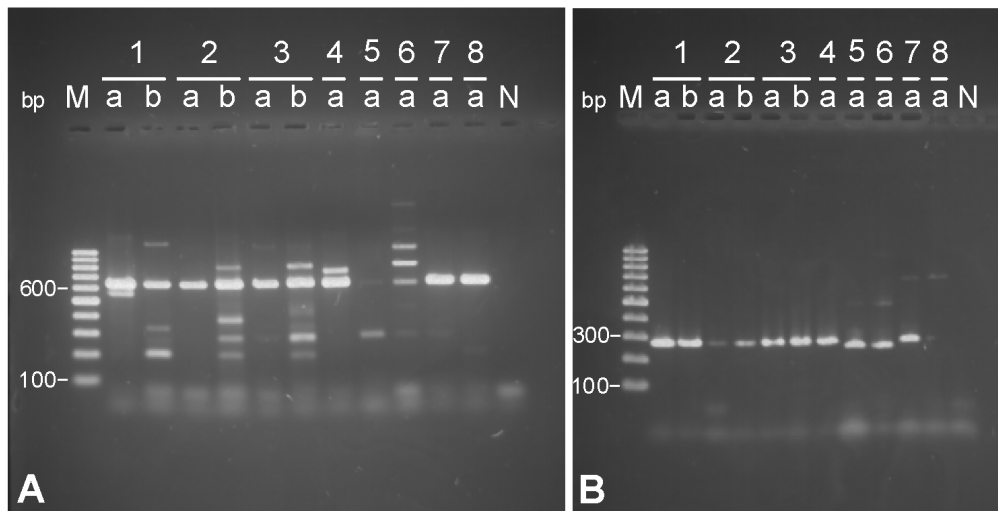


Abbildung 31: Nachweis der 618 bp-DNA von lp25 (Gel A) und der 280 bp-DNA von lp28-1 (Gel B) in Borrelien-Isolaten (Nr. 1-8).

Nr.1: *B. burgdorferi* s.s. N40; Nr.2: *B. afzelii* PKo; Nr.3: *B. afzelii* Slovakia; Nr.4: *B. garinii* PBi; Nr.5: *B. valaisiana* VS 116; Nr.6: *B. valaisiana* Rio 6; Nr.7: *B. spielmanii* A14S; Nr.8: *B. lusitaniae*. a: für die Inokulation verwendete Borrelien-Passage; b: aus murinen Geweben isolierte Borrelien in 1. Passage. M: molekularer Größenstandard - Größe in Basenpaarlänge (bp) N: Negativkontrolle (Wasser)

#### 4.2.4.2 Quantitative PCR (qPCR)

Der Nachweis des Borrelien-Gens *ospA* in murinen Geweben, insbesondere denen von der Inokulationsstelle weit entfernten Geweben sollte eine Infektion mit dem Spirochäten belegen, besonders wenn die Gewebekulturen bei vielen Mäusen negativ ausfielen. Es wurden Gewebe des Ohres und der Rückenhaut von jeweils mindestens drei Mäusen untersucht, die mit *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi, *B. afzelii* PKo, *B. afzelii* Slovakia und *B. spielmanii* inokuliert wurden. Proben von mit *B. lusitaniae*- oder *B. valaisiana*- inokulierten Mäusen wurden auf Grund eindeutig negativer serologischer Befunde der anderen Tests nicht untersucht. Einige Ergebnisse für Standards wie Positivkontrollen und Negativkontrollen sind für jede Borrelienspezies in Tabelle 24, Anhang Tabellen abgebildet. Die automatische Berechnung der  $C_t$ -Werte, sowie daraus die Anzahl der Borrelien pro 300 ng untersuchter DNA erfolgte auf der Basis der Standard-Verdünnungsreihen. Damit wurde eine Sensitivitäts- bzw. Detektionsgrenze ermittelt, die für jede durchgeführte qPCR berechnet wurde. Alle  $C_t$ -Werte, die numerisch höher als dieser ermittelte Wert lagen, wurden als negativ bewertet. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse für einzelne murine Gewebe im Vergleich zum direkten Borreliennachweis aus ihren Kulturen dargestellt. Gewebe von fünf mit *B. burgdorferi*-s.s.-N40-inokulierten Mäusen (Ohr oder Rückenhaut) wurden untersucht. Der theoretisch berechnete Borreliengehalt betrug zwischen 146.000 und 30 Zellen pro 300 ng muriner DNA. Dies bestätigte für vier der fünf Mäuse den direkten Spirochätennachweis per Gewebekultur.

Dagegen konnte ebenso wie aus den Gewebekulturen bei keinem der untersuchten Gewebe von *B.-garii*-PBi-inokulierten Mäusen Borrelien-DNA detektiert werden. In allen vier Mäusen, die mit *B. afzelii* PKo inokuliert wurden, konnte Borrelien-DNA detektiert werden, wobei 19 bis 222 Spirochäten pro 300 ng DNA errechnet wurden. Zwei mit *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierte Mäusen waren positiv (16,8 bis 30,2 Zellen/300 ng DNA). Trotz der negativen Gewebekulturen konnte in Rückenhäuten von allen drei mit *B.-spielmanii*-inokulierten Mäusen DNA von *B.-spielmanii-ospA* detektiert werden. Entsprechende Ohrgewebe waren aber negativ.

Tabelle 14: Quantitativer Nachweis von *ospA*-DNA in ausgewählten murinen Geweben im Vergleich mit den Daten der Rekultivierung von Borrelien aus diesen Geweben

Ergebnisse und Tests <sup>a</sup>			
Maus Nr.	Gewebe	qPCR	Kultur
<b><i>B. burgdorferi</i> s.s. N40</b>			
B07	Ohr	146.000	+
	Rücken	4940	+
B08	Ohr	-	+
B12	Ohr	-	+
	Rücken	199	+
B11	Ohr	568	+
B15	Ohr	20,9	+
B20	Ohr	531	+
<b><i>B. garinii</i> PBi</b>			
G07	Ohr	-	-
	Rücken	-	-
G09	Ohr	-	-
	Rücken	-	-
G13	Ohr	-	-
	Rücken	-	-
G18	Ohr	-	-
	Rücken	-	-
<b><i>B. afzelii</i> PKo</b>			
A08	Ohr	34,3	-
A13	Ohr	208	+
A15	Ohr	222	+
A17	Ohr	19	+
<b><i>B. afzelii</i> Slovakia</b>			
AS07	Ohr	30,2	+
AS14	Ohr	16,8	- <sup>b</sup>
AS15	Ohr	-	- <sup>c</sup>
<b><i>B. spielmanii</i> A14S</b>			
S13	Ohr	-	-
	Rücken	13,8	-
S14	Ohr	-	-
	Rücken	13.6	-
S17	Ohr	-	-

<sup>a</sup> Ergebnisse: +, positiv; -, negativ. qPCR: Berechnete Bakterienzahl per 300 ng muriner DNA

<sup>b</sup> Kontamination des Mediums, Borrelien konnte aus dem Gelenk isoliert werden

<sup>c</sup> Kontamination des Mediums, Borrelien konnte aus der Blase isoliert werden

## 5 Diskussion

Die sichere Diagnose der Lyme-Borreliose bei Mensch und Tier stellt seit deren Entdeckung im Jahr 1977 ein Problem dar. Als kritische Punkte sind eine lückenhafte Anamnese, unklare klinische Verläufe und mangelhafte Prophylaxemaßnahmen zu nennen. Aber auch der öffentliche, oft von Lobbyismus geprägte Umgang mit der Überschätzung des Vorkommens dieser Infektionserkrankung erschweren eine objektive Diskussion in der tierärztlichen Praxis. Umso zentraler ist die Bedeutung von zuverlässigen Nachweisverfahren, die eine potenzielle Infektion mit hochspezifischen Markern sicher erfassen und die Einschätzung klinischer Relevanz erleichtern. Das C6-Peptid stellt ein solches hochspezifisches Testsystem dar, dessen Möglichkeiten und Grenzen hier in veterinärmedizinisch relevanten Aspekten untersucht wurden und folgend erläutert werden sollen.

### 5.1 Serologische Studie

Bei der Auswertung der Vorberichte von den 510 untersuchten Hunden wurde für durchschnittlich 22,8 % der Tiere eine Borreliose-Impfung angegeben. Durch den Zweistufentest konnten schließlich für 23,5 % der Hunde impfspezifische Antikörper detektiert werden, dessen Ergebnisse damit nahezu mit den Vorbericht-Analysen übereinstimmen. Diese Daten sind interessant, da sich einerseits zeigte, dass die Impfpraxis von Tierärzten recht unterschiedlich ist (der Anteil vorberichtlich geimpfter Hunde reichte je nach Tierarztpraxis von 3,7 % bis zu 47,1 %) und andererseits, dass Borreliose-Impfungen mit dem hier angewandten Zweistufentestsystem sicher erfasst werden konnten. Ein großer Anteil der Hunde (44,5 %) wurde laut Vorbericht innerhalb der letzten zwei Jahre antibiotisch vorbehandelt. Über zehn Prozent der Tierärzte und Besitzer konnten dazu aber keine sicheren Angaben machen. Bezüglich der Wirkstoffe wurden die Penicilline mit insgesamt 43,2 % am häufigsten verwendet, was das Amoxicillin mit 35,2 % beinhaltete. Doxycyclin wurde dagegen restriktiver bei nur 7,6 % der Tiere eingesetzt. Sofern die Antibiose auf Grund einer Lyme-Borreliose-Infektion erfolgte (5,7 %,  $n = 13$ ), wurde aber in 92,3 % der Fälle Doxycyclin bevorzugt und nur in 7,7 % der Fälle Amoxicillin. Die Tatsache, dass für 48,6 % ( $n = 248$ ) der Hunde klinische Symptome zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme vorlagen, ergibt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Studienplanung, da Hunde bei Besuch der Tierarztpraxis aus diversen Gründen in die Studie aufgenommen wurden. Eine Vorselektion durch die Tierärzte sollte nicht erfolgen. Allerdings wählte Tierarztpraxis 8 offenbar speziell Hunde für die Blutentnahme aus, die der Tierarzt anhand der klinischen Veränderungen für Lyme-Borreliose-verdächtig hielt. Somit können die Faktoren wie subjektive Angaben der Besitzer für die Vorberichte und teils interessenbeeinflusste Vorselektionen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Anhand der Häufigkeitsanalyse sehr unspezifischer klinischer Veränderungen wie Lahmheit, Müdigkeit oder Fieber wurden vorberichtlich auf eine Lyme-Borreliose-Erkrankung hindeutende Parameter erfasst. Bei 12,1 % der Hunde mit klinischen Symptomen wurden Lahmheiten angegeben, bei nur 1,6 % Fieber und/oder Müdigkeit. Sehr interessant erscheint der Sachverhalt, dass bei 15 (2,9 %) aller

untersuchten Hunde vorberichtlich eine Lyme-Borreliose-Infektion oder ein Verdacht angegeben wurde. Sechs dieser 15 Hunde (40 %) wiesen klinische Veränderungen auf, davon fünf Hunde eine Lahmheit und ein Hund eine Glomerulonephritis. Nach der serologischen Untersuchung der 1. Blutproben zeigte sich aber, dass bei nur einem dieser Hunde (6,7 %) schließlich infektionsspezifische Antikörper sowohl in Zweistufentest, als auch C6-Schnelltest nachgewiesen werden konnten. Die anderen 14 Hunde (93,3 %) waren eindeutig seronegativ. Die Übereinstimmung von Vorbericht und Labordiagnose war damit äußerst gering. Von allen 510 untersuchten Hunden waren nur 3,3 % der Hunde (n = 17) als infiziert bzw. seropositiv einzustufen, wobei übereinstimmend sowohl der Zweistufentest, als auch der C6-Schnelltest positiv ausfielen. Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass oft wesentlich weniger Hunde als angegeben oder vermutet infektionsspezifische Antikörper aufweisen. Deshalb werden in der Praxis oft fälschlicherweise Infektionen angenommen, die zum Beispiel in zu sensitiven serologischen Testsystemen oder auch nur Vermutungen der Besitzer ihren Ursprung nehmen könnten. Durch vorherige Studien mit dem C6-Schnelltest konnte belegt werden, dass nur 4,1 % (TÖPFER 2005) bzw. 9,7 % (KRUPKA et al. 2007) der dort untersuchten Hunde seropositiv reagierten. Sicherlich sind auch die Aspekte des Vorkommens infizierter Zecken, Freizeitverhalten der Hundebesitzer sowie Prophylaxe und Aufklärung durch die Tierärzte beeinflussende Faktoren für regionale Seroprävalenzen. Im Zweistufentest reagierten in der vorliegenden Arbeit 8,6 % der Hunde unspezifisch, also seropositiv im ELISA, aber eindeutig negativ im Western-Blot. Diese Zahl an zunächst nicht klassifizierbaren, vermutlich kreuzreaktiven Antikörper-Reaktionen ist einer der Gründe, warum je nach Testsensitivität und Labor häufig falsch-positive Testergebnisse vorliegen. Solche Kreuzreakтивitäten können zum Beispiel durch Leptospiren verursacht werden (GREENE et al. 2006). Die Notwendigkeit eines spezifischen Western-Blots beweist sich bei Hunden, die gleichzeitig Antikörper gegen impf- und infektionsspezifische Antigene aufwiesen (IKK-9-06 oder IKK-50-10). Ein weiterer wichtiger Aspekt war die genauere Analyse von Vorberichten der 17 seropositiven Hunde, denn 82,4 % von ihnen hatten keinerlei klinische Krankheitsanzeichen (Tabelle 17.2, Anhang Tabellen). Dies überrascht zunächst besonders bei Hunden, die in KELA, Western-Blot und C6-Schnelltest sehr stark positiv reagierten, wie IKK-9-15 oder IKK-9-35. Beide Hunde wurden laut Vorberichten in den letzten zwei Jahren nicht antibiotisch vorbehandelt. Dies kann den stark positiven C6-Schnelltest erklären. Es belegt aber eindrucksvoll, dass natürliche Infektionen und infektionsspezifische Antikörper nicht in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung klinischer Lyme-Borreliose oder assoziierter Veränderungen stehen, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde (LEVY et al. 1992). Im Gegensatz dazu, bei experimentellen Infektionen von Hunden mit hohen Mengen von Borrelien, wurden mit der Serokonversion auch zumeist klinische Anzeichen wie arthritsbedingte Lahmheit beobachtet, was aber individuell von Immunstatus des Tieres abhing (GREENE et al. 2006; STRAUBINGER et al. 2000b). In der vorliegenden Arbeit wurden vorberichtlich für nur drei (17,6 %) der 17 C6-positiven Hunde klinische Veränderungen angegeben. Dabei handelte es sich um zwei

Lahmheiten und eine Hinterhandlähmung, was hypothetisch mit einer Lyme-Borreliose assoziiert werden könnte. Einer der Hunde (IKK-2-67) wurde bereits vier Monate zuvor wegen dieser Lahmheit mit Amoxicillin behandelt. Im Western-Blot zeigten sich schwache VlsE- und p83/100-Reaktionen (Abbildung 20), wobei der auch der C6-Schnelltest der 1. Blutprobe nur schwach positiv ausfiel. Zudem wurde auch eine schwache Reaktion gegenüber *A. phagocytophilum* nachgewiesen, die ebenfalls die klinische Symptomatik stützen könnte. Da der Hund nach der Antibiose mit Doxycyclin im Rahmen dieser Studie keinerlei Veränderungen mehr aufwies und sich die C6-Antikörperspiegel deutlich verringerten (im Schnelltest nicht mehr nachweisbar, im C6-ELISA gesunken), verbesserte vermutlich erst die wiederholte Therapie den Gesundheitszustand deutlich. Damit werden Beobachtungen bei experimentell infizierten Hunden gestützt, die schlussfolgern dass Borrelien eine antibiotische Behandlung trotz korrekten Therapieregimes überleben und reaktiviert werden können, was zu wiederkehrender Symptomatik führt (STRAUBINGER et al. 1997b; STRAUBINGER et al. 2000b). Insgesamt wurden von den 17 Hunden nur sechs Tiere antibiotisch aus unterschiedlichsten Gründen wie Operationen vorbehandelt, wobei unterschiedliche Wirkstoffe verwendet wurden. Betrachtet man die serologischen Daten dieser Hunde, so zeigten sich im Western-Blot bei den Hunden IKK-2-32, dem erwähnten IKK-2-67 und IKK-6-01 schwache Reaktionen gegenüber VlsE und Lysat-Antigenen im Western-Blot, dagegen unterschiedlich starke Reaktionen im C6-Schnelltest. Bei den übrigen vorbehandelten Hunden IKK-7-04, IKK-8-13 und IKK-6-26 lagen initial sehr deutliche Antikörperreaktionen gegenüber VlsE vor, die nicht mit den schwachen bis schwach-positiven C6-Schnelltestreaktionen übereinstimmten. Alle drei Hunde bekamen unterschiedliche Antibiotika zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor Studienbeginn, deren Einfluss auf die bereits initial schwachen C6-Antikörpertiter deshalb nicht ausgeschlossen werden konnte. Deutlich wird, dass die Entwicklung von IgG-Antikörpern gegen das „Muttermolekül“ VlsE und das C6-Peptid voneinander nicht abhängig ist, was auch die Untersuchung einer Studie mit humanen Sera ergab (EMBERS et al. 2007a).

Alle Besitzer der 17 seropositiven Hunde bewilligten eine antibiotische Behandlung. Die Therapie erfolgte bei 16 Hunden mit Doxycyclin, bei einem Hund mit Amoxicillin + Clavulansäure. Ein Besitzer brach die Therapie seines Hundes auf eigenen Wunsch hin ab, ein anderer Hund verstarb vor der Entnahme der 2. Blutprobe an einem Tumor. Laut der erneuten Vorberichte bei Entnahme der 2. Blutprobe vertrugen die Hunde die Antibiose gut. Bei zwölf der 15 Hunde, von denen eine 2. Blutprobe vorlag, wurden auch nach der Therapie keine klinischen Symptome beobachtet. Die Blutproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Therapie von den Hunden entnommen, da sich der erneute Tierarztbesuch bei vielen Hunden stark verzögerte und die Besitzer teilweise erst mehrfach zu einem erneuten Besuch gebeten werden mussten. Durch diese Heterogenität von Zeitintervallen zwischen Therapie und zweiter Blutentnahme konnte die zeitbedingte quantitative C6-Antikörperentwicklung nicht vergleichend untersucht werden, allerdings wurde in früheren Studien belegt, dass das deutliche Absinken der C6-Antikörperspiegel nach der Therapie vier bis



sechs Monate in Anspruch nahm (PHILIPP et al. 2001). Diese Reduktion war gegenüber nicht behandelten Kontrollhunden auch nach sechs bis zwölf Monaten noch deutlich (LEVY et al. 2008). Unter Einbeziehung der Daten von den zwölf seropositiven Hunden aus der retrospektiven Datenbankanalyse lässt sich erkennen, dass auch bei diesen Hunden die Entwicklung von klinischen Krankheitsbildern nach der Therapie sehr unterschiedlich verlief. Die Hunde wurden alle mit Doxycyclin behandelt, doch bei drei Hunden war keine Besserung der Lahmheit zu verzeichnen, bei zwei anderen besserte sich die Symptomatik nachhaltig. Interessant ist, dass trotz des Abbruchs der Therapie bei zwei Hunden (IKK-50-01 und IKK-50-10), sich die C6-Antikörperspiegel im C6-Schnelltest und C6-ELISA nachweisbar verringerten. Dies kann nur mit Vorsicht interpretiert werden, allerdings könnte auch diese unvollendete antibiotische Therapie zu partieller Erregerelimination und folglich einer Reduktion der C6-Antikörperspiegel geführt haben.

Nach gemeinsamer Analyse der Daten konnte im KELA bei 19 (70,4 %) der insgesamt 27 C6-positiven Hunde eine deutliche Reduktion der Antikörperspiegel nach der Therapie beobachtet werden. Dagegen zeigten dies im Western-Blot nur sieben Hunde deutlich, bei drei Hunden verschwand die VlsE-Reaktion ganz. Bei einem Großteil der Hunde ( $n = 19$ ) konnten aber vor und nach der Therapie keine bis nur minimale Unterschiede im Western-Blot nachgewiesen werden. Immunreaktionen gegen viele Hauptantigene von Borrelien können sehr lange bestehen bleiben oder durch Kreuzreaktivitäten wie zum Beispiel Impfantikörper beeinflusst werden. Deshalb eignen sich grundsätzlich weder der Lysat-Antigen-ELISA noch der qualitativ aussagekräftige Lysat-Antigen-Western-Blot für die mittelfristige Verlaufskontrolle einer Infektion (PHILIPP et al. 2001). Bei der Analyse mittels des C6-Testsystems konnte mit dem kommerziellen C6-ELISA eine Reduktion der C6-Antikörperspiegel bei 23 von 27 Hunden erfasst werden. Allerdings sollte dies nur bei 15 Hunden (55,6 %) berücksichtigt werden, da bei den anderen Hunden die Werte unter OD 0,2 lagen und die Reduktion nicht zuverlässig erfasst werden konnte (Abbildung 22). Für acht Hundesera (29,6 %) mit Initialwerten über OD 0,2 konnte eine Reduktion der C6-Antikörperspiegel um über 50 % vom Ausgangswert berechnet werden, was also mit einem Therapieerfolg korrelieren soll (ANON.VET MED LABOR 2008). In den letzten zwei Jahren zuvor wurde keiner der Hunde antibiotisch behandelt, was vermutlich entsprechend ideale Ausgangsbedingungen für die Entwicklung hoher C6-Antikörperspiegel schuf. Insgesamt vier Hunde, die sehr deutliche Reduktionen der C6-Antikörperspiegel im C6-ELISA zeigten, wie zum Beispiel IKK-9-15 und IKK-9-65, wiesen initial keine klinischen Erkrankungen auf, so dass davon kein klinischer Therapieerfolg abgeleitet werden kann. Dagegen konnte im Fall des zuvor lahrenden Hundes IKK-50-05, dessen C6-Antikörperspiegel nach der Therapie massiv sanken (98,9 %) eine Symptomfreiheit bei Entnahme der 2. Blutprobe bestätigt werden. Neben diesem Hund war auch IKK-50-06 nach der Therapie symptomfrei und dessen C6-Schnelltest wurde negativ. Bei zwei Hunden lagen auch nach der Therapie noch klinische Symptome vor. Damit wird deutlich, dass sich zwischen dem starken Sinken der C6-Antikörperspiegel als so genannter Therapieerfolg und der Ausprägung klinischer Symptome

keine Abhängigkeiten ergeben, sondern dies ein äußerst individueller Vorgang ist. Der Vergleich mit den Ergebnissen des C6-Schnelltests zeigt, dass mit ihm bei insgesamt bei 21 Hunden eine visuell abgeschwächte C6-Reaktion erfasst werden konnte. Diese Reduktion war graduell nach der Intensität der Baufärbung recht unterschiedlich stark ausgeprägt, aber stimmte bei zehn Hunden mit dem abgeschwächten C6-ELISA überein. Auffällig ist, dass auch sehr schwache initiale C6-Antikörperspiegel mit dem Schnelltest sicher erfasst wurden, die im C6-ELISA deutlich unter OD 0,2 lagen. Es konnten somit auch quantitativ sehr geringe Veränderungen der C6-Antikörperspiegel im Schnelltest visuell beobachtet werden. Allerdings war wiederum bei drei (IKK-1-22, IKK-9-15 und IKK-9-35) der acht Hunde mit über 50 %iger C6-Antikörperreduktion und OD-Werten über 0,2 keinerlei Abschwächung des C6-Schnelltests zu erkennen. Es kann deshalb festgestellt werden, dass mit dem C6-Schnelltest trotz seiner hohen Sensitivität bezüglich Veränderungen im Bereich schwacher Antikörperreaktionen, dagegen gerade die visuelle Feindifferenzierung im Bereich starker Farbreaktionen deutliche Schwächen aufweist und eine quantitative, vergleichende Bewertung nicht möglich ist.

Die Daten dieser Studie mit Hunden aus Deutschland bestätigen Hinweise durch bereits veröffentlichten Studien aus den USA, in welchen der C6-Antikörperspiegel einige Monate nach der Therapie deutlicher absinkt als der Antikörperspiegel gegen infektionsspezifische Ganzzell-Lysat-Antigene (PHILIPP et al. 2001). Demnach ist die Höhe des initialen C6-Antikörperspiegels maßgeblich für die erfassbare quantitative Reduktion der C6-Antikörperspiegel nach einer Therapie (LEVY et al. 2008). Somit könnte auch in der vorliegenden Arbeit einer vorherigen Antibiose von Hunden mit Borrelien-wirksamen Antibiotika wie Amoxicillin oder Doxycyclin die Höhe der danach messbaren C6-Antikörperspiegel negativ beeinflusst haben. Entsprechend niedrige initiale bis moderate C6-Antikörperspiegel erlauben keine sichere quantitative Kontrolle der C6-Antikörper nach einer Antibiose mehr. Somit kann auch die Empfehlung des Herstellers bestätigt werden, bei vorheriger Antibiose (einige Monate zuvor) mit Antibiotika die Zweistufen-Diagnostik mittels Lysat-Antigenen vorzuziehen, da der C6-Test negativ ausfallen könnte. Auf die Wichtigkeit der gründlichen klinischen Untersuchung und des Vorberichtes, nicht nur zur unterstützenden Diagnosefindung, sondern auch zu der Entscheidung für das jeweilige serologische Testsystem muss hier entsprechend deutlich hingewiesen werden. Allerdings kann unter Praxisbedingungen ein solcher lückenloser Vorbericht bezüglich einer Antibiose von den Tierbesitzern oft nicht erwartet werden, was den Tierarzt somit vor Entscheidungsprobleme stellt.

Nach eigenen Erfahrungen und dem Abschluss dieser Arbeit kann empfohlen werden, bei Hunden mit Borreliose-Verdacht einen C6-Schnelltest unter Praxisbedingungen für eine erste, schnelle Einschätzung des Antikörperstatus zu verwenden. Dies bietet auch den Vorteil, dass auf Grund des Testprinzips Antikörper gegen IgG und IgM gleichzeitig, also auch frühe potenzielle Infektionen erfasst werden können. Ist der Schnelltest deutlich positiv, kann von dem Vorhandensein metabolisch aktiver Borrelien im Hund ausgegangen werden und es kann bei Vorliegen hinweisender klinischer

Veränderungen sofort eine Antibiose eingeleitet werden. Es muss deutlich darauf hingewiesen werden, dass die Einleitung einer Behandlung bei dem Fehlen klinischer Symptomen in Fachkreisen umstritten und nach der Vorgeschichte des Hundes immer individuell zu entscheiden ist. Es sollte in jedem Fall eine labordiagnostische Abklärung des Schnelltest-Ergebnisses erfolgen. Ist der Schnelltest negativ und liegen dennoch verdächtige klinische Symptome oder Vorberichte vor, sollte nach Ausschluss anderer Differenzialdiagnosen eine serologische Diagnostik mittels Zweistufentest erfolgen, um Zweifel abzuklären. Deutlich ist auch noch einmal zu erwähnen, dass eine Impfreaktion nur mittels eines Lysatantigen-basierten Tests erfasst wird und nicht mit dem C6-Peptid nachgewiesen wird (O'CONNOR et al. 2004).

Die Empfehlung des C6-ELISA-Herstellers über die Einschätzung des Therapieerfolges anhand des Sinkens der initial hohen C6-Antikörperspiegel um über 50 % kann nicht unterstützt werden. Der Therapieerfolg einer Lyme-Borreliose sollte nicht auf Grund der Veränderung von Antikörperspiegeln, sondern muss unter Einbeziehung der Entwicklung klinischer Symptome überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit konnte bei nur acht solchen Hunden eine C6-Antikörper-Reduktion von über 50 % bestätigt werden. Die wenig deutliche Reduktion von Antikörperspiegeln trotz Therapie war dagegen bei sechs Hunden mit initialen OD-Werten über 0,2 zu erkennen und macht deutlich, dass der Effekt von vielen Faktoren abhängen kann. Bei dauerhaft symptomfreien Hunden ist das Sinken von initial hohen C6-Antikörperspiegeln (LEVY et al. 2008) auch in dieser Arbeit beobachtet worden. Allerdings ist dem Tierbesitzer schwer zu vermitteln, dass ein von vorn herein beschwerdefreier Hund nun erfolgreich therapiert wurde. Zudem ist dies nicht gleichbedeutend mit der endgültigen Eliminierung der Borrelien. Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass Antikörper gegen Borrelien nicht protektiv sind (LIANG et al. 2002; STEERE 2001a), somit jederzeit eine erneute Infektion durch Zeckenstiche nach der Therapie stattfinden kann. Der C6-ELISA kann zwar als unterstützende Maßnahme für die Therapiekontrolle empfohlen werden, um eine Aussage über die Menge von infektionsspezifischen Antikörper zu ermöglichen, kann deren direkten Erfolg aber nicht kontrollieren. Dagegen hat das C6-Testsystem in der Humanmedizin noch eine weitere wesentliche Bedeutung erlangt, da hier der Infektionszeitpunkt über den Tag des Zeckenstiches oder die Ausbildung eines EM oft rückverfolgt werden kann. Es wurde gezeigt, dass zur Detektion von frühen Infektionen bei Menschen VlsE oder C6 sensitiver ist als der klassische Lysat-Antigen-Zweistufentest (BACON et al. 2003). Nach der Behandlung solch früher Infektionen sinken die C6-Antikörper ebenfalls oft deutlich ab und korrelieren mit einem tatsächlichen Therapieerfolg, der auch über das Verschwinden klinischer Symptome messbar ist (PHILIPP et al. 2005; PHILIPP et al. 2003). Bei Patienten mit einer so genannten persistenten Lyme-Borreliose war der C6-Test zur Therapiekontrolle aber überhaupt nicht geeignet (FLEMING et al. 2004). Es konnte bewiesen werden, dass die C6-Antikörperspiegel bei korrekt behandelten Hunden (keine prädiagnostische Antibiose) im Gegensatz zu nicht behandelten Kontrollhunden nach 6 bis 12 Monaten um durchschnittlich 68 % absinken (LEVY et al. 2008). Es wurde in dieser Studie auch

darauf hingedeutet, dass dies maßgeblich von der richtigen Therapie, der ausreichenden Wirkstoffaufnahme und der Bereitschaft der Hundebesitzer abhängt, die teils kostenintensiven Therapien durchzuführen. Zudem kann der Infektionszeitpunkt beim Tier in der Regel nicht rückverfolgt werden. So können für veterinärmedizinische Anwendungen in praxi diese Unsicherheitsfaktoren nicht ausgeschlossen werden und begrenzen auch in dieser Arbeit letztendlich die sichere Datenerhebung. Das C6-Peptid sollte in der Veterinärmedizin deshalb in der Funktion als früher und hochspezifischer Infektionsmarker eine wesentlich größere Rolle spielen als für die Kontrolle von Therapieerfolgen und könnte zukünftig auch in der Tierarztpraxis die Lyme-Borreliose-Diagnostik objektivieren.

Mit dem C6-Schnelltest ließen sich bei den C6-positiven Hunden ebenfalls Antikörper gegen *A. phagocytophilum*, also somit eine potenzielle Koinfektion mit *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* nachweisen. Diese konnte hier bei insgesamt 15 (55,6 %) der 27 Hunde vor der Therapie nachgewiesen werden (Tabelle E20, Anhang Tabellen). Obwohl der Schnelltest dies nicht vorsieht, konnte bei 11 Tieren (40,7 %) auch eine Reduktion der *A.-phagocytophilum*-Antikörper-Reaktionen nach der Therapie erfasst werden. Mit dem ebenfalls gegen *A. phagocytophilum* wirksamen Doxycyclin konnten vermutlich auch Immunreaktionen gegen diesen Erreger deutlich vermindert werden. Die Antikörperreaktionen der seropositiven Hunde gegen verschiedene C6-Peptidvarianten werden unter der Einbeziehung der Daten des Tierversuchs unter Kapitel 5.2 diskutiert.

## 5.2 Infektionsversuch

Die ersten richtungsweisenden Ergebnisse zeigten die Daten der Kultivierung von Mausorganen in entsprechenden Nährmedien. Eine Isolierung von Borrelien aus 100 % der untersuchten Gewebe war für *B. burgdorferi* s.s. möglich, gefolgt von mit *B.-afzelii*-PKo- und *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierten Mäusen (70 % bzw. 55 % kulturpositiver Tiere). Damit konnte bereits über diesen direkten Erregernachweis eine erfolgreiche Infektion der Tiere bewiesen werden. Bei den beiden letztgenannten Mausgruppen war vorwiegend der Nachweis von Spirochäten aus Blase und Herz möglich, wohingegen die Hautgewebe von Ohr und Rücken sowie Gelenke oft negativ bzw. sekundär durch bakterielle Keime kontaminiert waren. Obwohl die Mausorgane unter sterilen Bedingungen gewonnen und bearbeitet wurden, lassen sich Kontaminationen durch Hautflora-Keime der Maus oder auch Verunreinigungen durch murine Fäkalkeime nicht gänzlich ausschließen, da diese unter Umständen der Haut/dem Fell anhaften und durch das Zerkleinern der Organe in tiefere Gewebeschichten gelangen. Somit kann auch trotz des Vorhandenseins von Borrelien die Gewebekultur durch Überwucherung anderer Bakterien negativ ausfallen. Deshalb ist die Gewebekultur von vermeintlich infizierten Geweben für die Lyme-Borreliose-Diagnostik allein nur eingeschränkt aussagekräftig, denn die negativen Organkulturen von mit *B.-garrinii*-, *B.-lusitaniae*-, *B.-spielmanii*- und *B.-valaisiana*- inokulierten Mäusen schließen eine erfolgreiche Infektion der Tiere

vorerst noch nicht aus. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit dem Zweistufentest bestätigen zunächst die Kultivierungsergebnisse für die mit *B. burgdorferi*-s.s., *B. afzelii*-PKo- und *B. afzelii*-Slovakia- inokulierten Mäuse. Hier ließen sich im KELA deutliche, zunehmende Antikörperreaktionen nachweisen, die auch im Western-Blot jeweils gegen VlsE und andere spezifische Proteine zu erkennen waren. Da dieses ebenfalls für Mäuse zutraf, die mit *B. spielmanii* inokuliert wurden, können die negativen Gewebekulturen hier vermutlich auf ein nicht erfolgtes Wachsen der Borrelien in dem Kulturmedium zurückgeführt werden. Dies lässt sich durch das bereits in den Vorversuchen zur Optimierung der Mediumqualität beobachtete langsame Wachstum von *B. spielmanii* trotz guter Vitalität erklären. Nur drei Mäuse (G07, G13 und G18) die mit *B. garinii* PBi inokuliert wurden, zeigten sowohl in KELA als auch Western-Blot mit dem Vorhandensein von Reaktionen gegen VlsE und weitere spezifische Proteine seropositive Reaktionen. Der KELA (Abbildung 24, Grafik B) war zwar bei weiteren elf Mäusen als positiv zu bewerten, allerdings nicht der Western-Blot (Anhang Abbildungen, Abbildung A6). Erst der Western-Blot konnte die ausreichende Spezifizierung der Immunantwort gewährleisten, deshalb wurden alle Mäuse, die mit *B. lusitaniae* oder *B. valaisiana* inokuliert wurden, als seronegativ eingestuft, was sich hier mit den negativen Ergebnissen der Gewebekultivierung deckt. Den Grund für eine nicht erfolgreiche oder erfolgreiche Infektion der Mäuse kann in der Charakteristik der verwendeten Borreliensämme- und -isolate gesucht werden. Den Verlust der Infektiosität von Borrelien in Folge von mehreren *in vitro*-Passagen wurde in vielen Studien beschrieben (NORRIS et al. 1995; SCHWAN et al. 1988; THOMAS et al. 2001). Neben diesen Gründen kann vor allem das Fehlen der linearen Plasmide lp25 und lp28-1 (kodiert auch für VlsE) für mangelnde Persistenz oder Infektionspotenzial im Wirbeltierwirt verantwortlich gemacht werden (LABANDEIRA-REY et al. 2003). Obschon dies bisher nur für *B. burgdorferi* s.s. bewiesen wurde, kann es auch für andere Borrelienspezies wie *B. afzelii* und *B. garinii* angenommen werden, da diese Spezies auch VlsE tragen. Die PCR-Ergebnisse stützen diese Vermutung in Kombination mit den Daten der Kultur und Serologie. Für beide *B. valaisiana*-Stämme wurde das Fehlen von lp28-1 und lp25 bestätigt (Abbildung 31), sowie das Fehlen von lp28-1 für *B. lusitaniae*. Damit wird für die verwendeten *B. valaisiana*-Stämme das Fehlen des Infektionspotenzials angenommen und für *B. lusitaniae* das Unvermögen für die Etablierung einer persistenten Infektion. Für *B. burgdorferi* s.s., beide *B. afzelii*-Stämme bzw. Isolate und *B. spielmanii* bestätigte sich das Infektionspotenzial mit dem Vorhandensein beider Plasmide. Dagegen schien das Potenzial, eine deutlich infektionsbedingte Immunantwort in Mäusen auszulösen, bei *B. garinii* PBi trotz Präsenz beider Plasmide eingeschränkt zu sein. Dies lässt sich nur schwer erklären, da *B. garinii* PBi grundsätzlich Mäuse infizieren kann (CRAIG-MYLIUS et al. 2009). Eine spezifische, eventuell passagebedingte Charakteristik dieses Isolates wird deshalb angenommen. Die quantitative PCR wurde für die Detektion von *B. lusitaniae*- und *B. valaisiana-ospA*-DNA nicht mehr durchgeführt, da die mangelnde Infektionsfähigkeit der hier verwendeten Isolate aus dieser Studie hervorging. Um den direkten Erregernachweis durch die Gewebekultur zu ergänzen, wurde die

*ospA*-qPCR für einige Mäuse aus den Geweben Rücken (Ort der Inokulation) und Ohr (weit entfernt, Dissemination beweisend) durchgeführt. Generell konnte DNA von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. spielmanii* nachgewiesen werden. Dabei wurde in einigen Mäusen, deren Gewebe in der Kultur positiv waren, keine Borrelien-DNA detektiert, für *B. spielmanii* generell nur aus Rückenhaut. Auch der direkte Erregernachweis mittels qPCR kann nicht immer eine ausreichende Sensitivität des Detektionssystems bieten, die ebenfalls von der individuellen Erregerlast des untersuchten Gewebes abhängt. Für *B. spielmanii* kann angenommen werden, dass eine Dissemination in weit entfernte Körpergewebe nicht oder nur in geringem Umfang erfolgte, da die DNA nicht in den Häuten der Ohren detektiert wurde. Die Sensitivität des Testsystems war vermutlich für die Detektion von *B.-garii*-PBi-DNA zu gering (Tabelle E24, Anhang Tabellen), da auch am Ort der Inokulationsstelle (Rücken) keine Borrelien-DNA nachgewiesen wurde. So konnte gezeigt werden, dass trotz des Ausschöpfens vieler diagnostischer Möglichkeiten der Beweis einer Infektion im Sinne der Erkenntnisse von Jakob Henle, Robert Koch und Friedrich Loeffler (GRADMANN 2008) mit einem generell schwer nachweisbaren Erreger wie *B. burgdorferi* in Einzelfällen nur eingeschränkt möglich ist bzw. eines großen, wiederholten diagnostischen Aufwandes bedarf.

Wie bereits eingehend erläutert, könnte das C6-Peptid diesen diagnostischen Aufwand in der Serologie deutlich einschränken. Analog der Ergebnisse der Serologie mittels Lysat-Antigenen konnten auch mit den verschiedenen C6-ELISA-Systemen keine spezifischen Immunreaktionen gegen *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* nachgewiesen werden (Abbildungen 27 bis 30, Grafiken E und F). Da im Vorfeld bereits eine erfolgreiche Infektion ausgeschlossen wurde, werden diese Daten hier nicht weitergehend diskutiert. Die mit den murinen Sera durchgeführten ELISAs auf der Basis verschiedener C6-Peptide sollte die Anwendbarkeit für die Serodiagnose in Europa mit einem Infektionsmodell überprüfen, das definierte Bedingungen für die Messung speziesspezifischer C6-Antikörper gewährleistet. Damit sollte ermittelt werden, in wie fern Kreuzreaktivitäten der speziesspezifischen C6-Antikörper bei der Messung mit verschiedenen C6-Peptiden vorliegen und ob stark speziesspezifische Tendenzen vorliegen, welche die Nutzbarkeit für die europäischen Verhältnisse beeinflussen könnten. Die Sensitivitäten der C6-Peptide wurden an den Ergebnissen des Zweistufentests als Standardmethode etabliert. Diese Daten zeigen (Tabelle 13), dass Antikörper gegen *BbC6* oder *BgC6* mit jeweiligen Sensitivitäten von 100,0 % detektiert werden konnten, wobei auch die entsprechende Kreuzreaktivität untereinander gegeben war. Die C6-Antikörperspiegel gegen *B. burgdorferi* s.s. und *B. garii* waren zudem generell höher, wenn *BgC6*-Peptid zur Detektion verwendet wurde. Dies bestätigt Studien, die ein einzelnes C6-Peptid von *B. garii* oder *B. burgdorferi* s.s. verwendeten und daraus schlossen, dass die IR6-Sequenzen zwischen *B. burgdorferi* s.s. und *B. garii* konserviert sind (LIANG et al. 2000b; LIANG et al. 2000a; LIANG et al. 1999c). In der vorliegenden Arbeit ermittelte Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis von C6-Antikörpern gegen *B. garii* PBi mit dem *BaC6*-Peptid nicht zufriedenstellend ist (Sensitivitäten von 0,0 % bzw. 33,3 %). Allerdings konnten nur drei *B.-garii*-inokulierte Mäuse anhand serologischer Daten als

potenziell infiziert bezeichnet werden und eine aussagekräftige Datenerhebung ermöglichen. Wenig Sensitivität bot auch der Nachweis von C6-Antikörpern aus *B.-burgdorferi*-s.s.-inokulierten Mäusen mit beiden BaC6-Peptiden (40,0 % bzw. 65,0 %). Antikörper gegen *B. spielmanii* A14S konnten mit den verwendeten Peptidvarianten nur in sehr geringem Umfang detektiert werden, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Speziespezifität zurückzuführen ist. Die höchste Sensitivität wies BbC6 mit 52,9 % auf. Die Sequenz von VlsE für diese Borrelienart war zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht. Welche Relevanz die Detektion von *B. spielmanii* in der serologischen Diagnostik hat und haben wird, müssen weitere klinische Untersuchungen über dessen Pathogenität klären. Es zeigte sich aber hier, dass das Zweistufentestsystem mit Lysat-Antigenen von *B. burgdorferi* s.s. (KELA) und *B. afzelii* (Western-Blot) Gesamtantikörper gegen *B. spielmanii* sicher detektieren kann. Deshalb sind gerade für besondere Fragestellungen wie diese, die Sensitivität und Spezifität des Zweistufentests weiterhin nicht durch einen C6-Einstufentest zu ersetzen.

Die individuellen C6-Antikörperspiegel zwischen den Mäusen einer Gruppe variierten deutlich (Abbildungen 27 bis 30). Dies kann auf individuelle Kapazitäten der Antikörperbildung und Charakteristika des Immunsystems beruhen, auf entsprechende Antigenlasten zu reagieren. Sehr interessant ist der Vergleich der Ergebnisse der Mausgruppen, die mit *B. afzelii* PKo oder *B. afzelii* Slovakia inokuliert wurden. Die gemessenen C6-Antikörperspiegel im Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>-ELISA waren in mit *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierten Mäusen generell niedriger als in mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäusen (Abbildung 26). Des Weiteren reagierten mehr mit *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierte Mäuse seronegativ gegenüber C6-Peptiden von *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* oder *B. afzelii* als die mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäuse (Abbildung 27 bis 30). Die *B.-afzelii*-Speziesidentität beider verwendeter Borrelienisolate wurde daraufhin mittels Sequenzierung des *ospA*-Gens mit einer 600-bp-amplifizierenden 16S-DNA-PCR (RICHTER et al. 2003) durch Frau Dr. Dania Richter, Institut für Pathologie, Sektion Parasitologie, Charité Berlin bestätigt (persönliche Mitteilung).

Derart deutliche serologische Unterschiede wurden interessanterweise nicht bei der Verwendung von Lysat-Antigen im Zweistufentest beobachtet. Gerade im Vergleich der Western-Blots (Abbildungen 25 und Abbildungen A7 bis A8 im Anhang Tabellen), die auf *B.-afzelii*-Lysat-Antigen basieren wird deutlich, dass beide *B.-afzelii*-Isolate sehr ähnliche Intensitäten und Bandenmuster aufwiesen, die klar für eine Infektion sprachen. Dafür reagierten weniger mit *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierte Mäuse serologisch positiv auf rekombinantes VlsE (17 von 20 Mäusen, 85,0 %; Tabelle 12). Dies könnte, neben interindividuellen Unterschieden der Immunreaktionen oder auch eines Mangels am Testkit, ein Hinweis darauf sein, dass diese Borrelien das VlsE-Protein weniger stark oder auf unterschiedliche Art exprimieren, so dass sich die VlsE-Antigenität dieses Borrelienstammes verändert. Dies könnte sich auch in niedrigerer Reaktivität gegenüber dem C6-Peptid niedergeschlagen haben. Ein anderer Grund für die höhere Sensitivität der Sera von mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäusen gegenüber BaC6 könnte sein, dass diese Antikörper effektiver an C6-

Peptide auf der Sequenzbasis von *B. afzelii* ACA-1 binden, welche hier verwendet wurden. Entsprechend wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit eine Stamm- bzw. Isolatabhängigkeit der Borrelienspezies sowohl auf der Seite der C6-Antikörper, als auch auf der Seite der C6-Peptide/Aminosäuresequenz vermutet, welche für den Infektionsversuch mit *B. afzelii*-Isolaten deutlich wurden. Damit müsste die Wahl der C6-Peptidsequenz für ausreichend sensitive Testanwendungen in Europa nicht nur nach zu Grunde liegender Borrelienspezies, sondern auch des Stammes oder Isolates sehr vorsichtig getroffen werden. Eine neuere Studie aus den USA beschreibt dagegen wenig Sensitivitätsverlust bei der Verwendung eines C6-ELISA bei der Detektion von Antikörpern gegen verschiedene *ospC*-Genotypen oder Stämme von *B. burgdorferi* s.s., aus den USA (WORMSER et al. 2008). Im Gegensatz zu *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi und *B. afzelii* PKo, die in Tier (Maus oder Hund) (BARTHOLD 1999; CRAIG-MYLIUS et al. 2009; STRAUBINGER et al. 1998) und Mensch (FINGERLE et al. 2007; WILSKE et al. 1996a) als pathogen gelten, ist über Infektiosität, sowie insbesondere die Pathogenität des hier verwendeten Isolates *B. afzelii* Slovakia nichts bekannt. Deshalb kann dessen klinische Bedeutung für empfängliche Tierarten und den Menschen in Europa noch nicht abgeschätzt werden. Die standardisierten Bedingungen des Infektionsversuchs in der vorliegenden Arbeit erlaubten eine genaue Charakterisierung der C6-Antikörper in Tieren mit definierten Monoinfektionen. Insgesamt kann die Verwendung von C6-Peptiden auf der Basis von *B. garinii* oder *B. burgdorferi* s.s. empfohlen werden, denn beide detektieren auch Antikörper gegen *B. afzelii* PKo. Zudem zeigten sich hier keine Einbußen bei den verwendeten Varianten von BaC6 (jeweils 100,0 %), doch umgekehrt bei der Detektion von Antikörpern gegen *B. garinii* und *B. burgdorferi* s.s.. Aus diesem Grund könnte für zukünftige Testsysteme in Europa eine Kombination von BaC6-Peptiden und Peptiden von *B. burgdorferi* s.s. oder *B. garinii* in Erwägung gezogen werden, aber keine alleinige Verwendung von *B. afzelii*-C6-Peptiden. Dies empfehlen auch einige Studien aus der Humanmedizin, die Sera von europäischen Patienten (Borreliose-stadium-abhängig) mit verschiedenen C6-Peptiden untersuchten. Auch hier waren die Kreuzreaktivitäten zwar weitgehend sehr zufriedenstellend, aber partiell wurden auch je nach C6-Peptid und Erkrankungsstadium der Patienten zu geringe Sensitivitäten ermittelt (SILLANPAA et al. 2007; TJERNBERG et al. 2008; TJERNBERG et al. 2009). Weitere intensive Untersuchungen dieser Aspekte werden in Zukunft notwendig sein.

Einen ersten Hinweis für eine Einschätzung der Anwendbarkeit und Kreuzreaktivität von verschiedenen C6-Peptiden bei kaninen Sera aus Deutschland (respektive Europa) gab die Durchführung der speziesspezifischen C6-Peptid-ELISA mit Hundesera vor der Antibiose aus der serologischen Studie (Abbildung 23). Die Kontrollsera (S98 4/12 und Cal 4), welche von mit *B. burgdorferi*-s.s.-infizierten Hunden aus den USA stammen, zeigten deutliche Antikörperspiegel über OD 0,2. Bereits mit diesen beiden Sera ist zu erkennen, dass die C6-Antikörperspiegel bei der Detektion mit BgC6 gefolgt von BbC6 wesentlich höher lagen als bei der Verwendung der beiden Ba-basierten C6-Peptide (BaC6-1 und BaC6-2). Ein analoges Bild wies die Untersuchung von



Hundesera wie IKK-1-22, IKK-9-15 oder IKK-50-05 auf, wobei beide letztgenannten Sera nahezu überhaupt nicht auf *BaC6* reagierten. Sowohl der Zweistufentest, als auch der C6-Schnelltest und kommerzielle C6-ELISA reagierten bei diesen Sera aber deutlich positiv. IKK-2-42 reagierte im Gegensatz zu dem Großteil der anderen untersuchten Sera nicht deutlich auf *BbC6*, sondern am stärksten auf *BgC6* und *BaC6-2*. Serum IKK-2-55 zeigte hohe Antikörperspiegel auf gegenüber allen vier C6-Peptiden, wobei selbst der niedrigste gegen *BaC6-1* mit 0,57 OD noch sehr deutlich ausfiel. Zusammenfassen lässt sich aus diesen Beobachtungen zunächst schließen, dass das C6-Peptid auf der Basis von *B. afzelii* gegenüber *BbC6* und *BgC6* in der serologischen Diagnostik bei Hunden nicht sensitiv genug ist, um potenziell vorkommende Immunreaktionen gegen den *Bbsl*-Komplex zuverlässig zu detektieren. Die Möglichkeit, mit den Reaktionen der kaninen Sera gegenüber speziesspezifischen C6-Peptiden auf die potenziell infizierende *Borrelien*art, oder gar die Art der Mischinfektion der Hunde mit verschiedenen *Borrelien*arten rückzuschließen, ist ausdrücklich nicht gegeben. Die Kreuzreaktivitäten von sowohl *BbC6* als auch *BgC6* erwiesen sich sowohl im Infektionsversuch als auch in der serologischen Studie als hoch und erlauben keine Speziesdifferenzierung anhand der C6-Immunantwort. Einzelne Hundesera reagierten aber sogar intensiver gegenüber *BaC6*. Entsprechend kann in derartigen Einzelfällen eine mangelnde Sensitivität eines einzelnen C6-Peptids angenommen werden. Dies kann bedeuten, dass die serologischen Ergebnisse bei Testsystemen, die wie bisher mit nur einem speziesspezifischen C6-Peptid arbeiten, bei der Erstellung von entsprechenden Schwellenwerten falsch negativ bewertet werden. Gerade hier ergäbe sich also die Notwendigkeit, das C6-Peptid auf der Basis von *B. afzelii* in serologische Testsysteme für den europäischen Markt zu integrieren oder Mischpeptide aus verschiedenen speziesspezifischen C6-Sequenzen zu verwenden, um dem Vorkommen von Antikörpern gegen die infektiösen *Borrelienspezies* in Europa gerecht zu werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit aus serologischer Studie und Infektionsversuch zeigen, dass der serologische Nachweis mit dem C6-Peptid deutliche, praxisrelevante Vorteile bietet. Allerdings ergibt sich gerade bei detaillierter Betrachtung von Einzelfällen wiederum die Notwendigkeit der Verwendung weiterer direkter oder indirekter Testsysteme. Auch kann von einer *Borrelienstamm-spezifischen* Sensitivitätscharakteristik der entsprechenden C6-Antikörper ausgegangen werden, die zukünftig genauer untersucht werden muss. Aus diesen Gründen ist das C6-Peptid, obschon teilweise propagiert, kein Ersatz für das Lysat-Antigen-basierte Zweistufentestsystem in der veterinärmedizinischen *Borreliose*-Diagnostik oder eine detaillierte und wiederholte gründliche klinische Anamnese. Es besteht weiterer, intensiver Forschungsbedarf bezüglich der Anwendbarkeit und Testkonzipierung auf Basis der C6-Peptide. Dennoch ist das C6-Peptid eine zukunftsweisende, sinnvolle Ergänzung in der für Tierärzte schwierigen Einschätzung klinisch relevanter *Borreliose*-Infektionen bei Hunden in Deutschland.

## 6 Zusammenfassung

Inke Krupka

Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato und deren serologischer Nachweis mittels spezifischer C6-Peptide bei Hunden sowie im murinen Infektionsmodell

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im August 2009

107 Seiten, 31 Abbildungen, 14 Tabellen, 201 Literaturangaben, Anhang (24 Tabellen, 9 Abbildungen)

Schlüsselwörter: *Borrelia burgdorferi*, Lyme-Borreliose, Hund, ELISA, Western-Blot, C6-Peptid

Die sichere Diagnose der Lyme-Borreliose und der Nachweis des verursachenden Spirochäten *Borrelia burgdorferi* bei Mensch und Tier sind problematisch. In Nordamerika ist *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.) die einzige pathogene Spezies, während in Europa und Asien mit *B. garinii* und *B. afzelii* mindestens zwei weitere pathogene Arten vorkommen. *B. valaisiana*, *B. spielmanii* und *B. lusitaniae* werden ebenfalls als Verursacher der Lyme-Borreliose diskutiert. Der indirekte Erregernachweis durch Detektion von Antikörpern mittels Antigen aus Borrelienlysate im Zweistufentest (ELISA und Western-Blot) gilt seit langem trotz der anspruchsvollen Interpretationskriterien als Methode der Wahl. Ein hochspezifischer ELISA mit dem synthetischen C6-Peptid als Antigenkomponente ergänzt erst seit wenigen Jahren die Diagnostik. Das C6-Peptid basiert auf der invariablen Region 6, welche eine konstante Region des ansonsten hochvariablen Borrelien-Oberflächenproteins VlsE darstellt. Nur metabolisch aktive Borrelien exprimieren VlsE/C6-Epitope im Säugetierwirt. Studien zeigten, dass C6-Antikörper mehrere Monate nach einer potenziell erfolgreichen antibiotischen Therapie deutlich messbar und langfristig absinken. In Deutschland sind ein C6-Schnelltest (4Dx<sup>®</sup>SNAP<sup>®</sup>, IDEXX Inc., USA) und ELISA (Quant C<sub>6</sub><sup>®</sup>, IDEXX Inc., USA) für die Serodiagnostik bei Hunden erhältlich.

Über die Anwendbarkeit des C6-Peptids für die kanine Borreliosedagnostik in Deutschland liegen wenige Daten vor, aber zunehmend wird der Ersatz des Zweistufentests durch das C6-Peptid diskutiert. In dieser Arbeit sollte zunächst festgestellt werden, ob potenzielle kanine Infektionen in der Routinediagnostik mit dem C6-Peptid ebenso sensitiv detektiert werden können wie mit dem Zweistufentest und ob C6-positive Hunde nach einer Antibiose mit dem deutlichen Sinken der C6-Antikörperspiegel als Zeichen eines potenziellen Therapieerfolges reagieren. Dafür wurden

510 Sera von Hunden aus verschiedenen deutschen Tierarztpraxen untersucht, wobei neben der serologischen Untersuchung eine Analyse der Vorberichte erfolgte. Eine dort angegebene, bestehende Infektion konnte in 93,3 % der Fälle serologisch nicht bestätigt werden und nur bei 3,3 % der Hunde wurden infektionsspezifische Antikörper ermittelt. Der Zweistufentest und der C6-Schnelltest wiesen hier eine vollständige Übereinstimmung auf. Unabhängig vom Vorliegen klinischer Anzeichen wurden für diese Studie C6-positive Hunde mit Antibiotika behandelt. Vier bis 18 Monaten nach der Therapie wurde von insgesamt 27 Hunden eine zweite Blutprobe untersucht. Die C6-Antikörperspiegel waren bei acht Hunden im ELISA um mindestens 50 % gesunken. Für deutliche Effekte musste aber ein ausreichend hoher initialer C6-Antikörperspiegel vorliegen.

Da in Europa mindestens drei pathogene Borrelienarten vorkommen, wurde in einem murinen Infektionsmodell analysiert, ob speziesspezifische C6-Peptide von *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und zwei Varianten von *B. afzelii* sicher Antikörper detektieren, die durch definierte experimentelle Monoinfektionen mit *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi, *B. afzelii* Slovakia, *B. afzelii* PKo, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* oder *B. lusitaniae* induziert wurden. Um die erfolgreiche Infektion zu belegen, wurden murine Gewebe zur Borrelienisolation in Kulturmedien inkubiert und zusätzlich eine qPCR zum Nachweis von *ospA* durchgeführt. Eine PCR zur Detektion von essenziellen Plasmiden ergab, dass die *B. lusitaniae*- und *B. valaisiana*-Isolate nicht infektiös waren. Eine Infektion konnte durch Gewebekultur und qPCR dagegen bei mit *B. burgdorferi*-s.s., *B. garinii*-, *B. afzelii*- und *B. spielmanii*-inokulierten Mäusen belegt werden. Die Ergebnisse des C6-Peptid-ELISAs wurden mit dem des Zweistufentests als Goldstandard verglichen und die Sensitivitäten der C6-Peptide ermittelt. Diese betrug bei C6-Peptiden von *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* je 100 % für *B. burgdorferi* s.s.-N40, *B. garinii*-PBi- oder *B. afzelii*-PKo-spezifische C6-Antikörper. Dagegen konnten C6-Peptide basierend auf *B. afzelii* nur *B. afzelii*-PKo-spezifische Antikörper zu 100 % erfassen. Antikörper gegen *B. afzelii* Slovakia wurden von jedem C6-Peptid schlechter erfasst als Antikörper gegen *B. afzelii* PKo, was das Vorkommen stamm- oder isolatspezifischer C6-Antikörperfraktionen nahelegt. Die Untersuchung der 27 C6-positiven Hundesera aus der serologischen Studie ergab zudem, dass der Großteil der Sera ausschließlich gegenüber *B. burgdorferi*-C6 und *B. garinii*-C6 deutlich messbar reagierte.

Die Eignung des C6-Peptids in praxi als ein schneller, hochspezifischer Infektionsmarker für den serologischen Nachweis bei Hunden aus Deutschland kann bestätigt werden. Allerdings kann der alleinige Nachweis von C6-Antikörpern weder einen detaillierten Vorbericht, noch den Zweistufentest auf Lysantigen-Basis ersetzen. Seine Eignung als Marker für einen potenziellen Therapieerfolg ist nur unter definierten Bedingungen gegeben. Die divergenten Sensitivitäten verschiedener C6-Peptidsequenzen gegenüber Antikörpern von in Europa vorkommenden Borrelien-Arten und -Isolaten machen deutlich, dass zukünftig weiterer, intensiver Forschungsbedarf bezüglich der Etablierung von ausreichend sensitiven C6-Testsystemen für europäische Bedürfnisse notwendig ist.

## 7 Summary

Inke Krupka

Infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and antibody detection in dogs and in a murine infection model using specific C6-peptides

Institute of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2009

107 pages, 31 figures, 14 tables, 201 references, appendix (24 tables, 9 figures)

Key words: *Borrelia burgdorferi*, Lyme borreliosis, dog, ELISA, Western blot, C6-peptide

The definite diagnosis of Lyme borreliosis and the detection of the disease-causing spirochete *Borrelia burgdorferi* in humans and animals are difficult. In North America, *B. burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.) is the only pathogenic species, while with the additional presence of *B. garinii* and *B. afzelii* in Europe and Asia at least two further pathogenic species are present. *B. valaisiana*, *B. spielmanii* and *B. lusitaniae* are discussed to cause Lyme borreliosis as well. The indirect detection of antibodies against the spirochetes by utilizing a bacterial lysate as antigen source in a two-tiered-testing system (ELISA combined with a Western blot) is still the first choice despite its demanding interpretation criteria. A highly specific ELISA based on the synthetic antigen C6 complements the diagnostic procedure since a few years. The C6-peptide originates in the invariable region 6, which represents a constant region of the highly variable borrelial surface protein VlsE. Only metabolically active spirochetes express the VlsE/C6-epitopes in the mammalian host. Studies showed that C6-specific antibody levels may dramatically decrease months after a successful antibiotic therapy. In Germany, a C6-rapid-test (4Dx<sup>®</sup> SNAP<sup>®</sup>, IDEXX Inc., USA) and C6-ELISA (Quant<sup>®</sup>C<sub>6</sub>, IDEXX Inc., USA) are available for the detection of specific antibodies in dogs.

Only a few data are available regarding the applicability of the C6-peptide as a diagnostic tool for the diagnosis of canine Lyme borreliosis in Germany. However, its use as a replacement of two-tiered testing is increasingly discussed. Thus, this study should ascertain whether the C6-peptide can detect potential canine infections as sensitive as the two-tiered-testing system and whether those C6-positive dogs show a clear decrease of C6-specific antibodies after antibiotic therapy as a supposed sign of successful treatment. Therefore, 510 sera from dogs of different veterinary practices in Germany were tested using C6-based methods and the anamnestic data were recorded. From all stated infections,

93.3% could not be confirmed serologically. Only 3.3 % of all dogs had specific antibodies indicative for infection. The two-tiered testing and C6-rapid-test showed full agreement. The C6-antibody-positive dogs were treated with antibiotics independent of the presence of clinical signs. Four up to 18 months after therapy, a second serum sample was tested from 27 dogs. The C6-specific antibodies decreased in eight dogs for more than 50 % of the basal levels. A clear effect was dependent on the initial height of the antibody levels.

Since at least three potentially pathogenic *Borrelia* species are present in Europe, a murine infection model was employed in order to analyze, if species-specific C6-peptides can precisely detect antibodies induced by *B. burgdorferi* sensu stricto or *B. garinii* and two variants of *B. afzelii*. Defined infections by single *Borrelia* species were provoked by needle injections of *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi, *B. afzelii* Slovakia, *B. afzelii* PKo, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* or *B. lusitaniae*. To document the successful infection of mice, tissues were incubated in culture media for spirochete detection and in addition a quantitative PCR detecting the borrelial *ospA* was performed. A PCR identifying the plasmids lp25 and lp28-1 showed that *B. lusitaniae* and *B. valaisiana* isolates used in this study were not infectious due to the lack of these plasmids. Mice inoculated with *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. spielmanii* on the other hand carried thriving infections. The results of C6-peptide-based ELISA were compared with those obtained with the two-tiered-test system used as the gold-standard and the sensitivities of C6-peptide-based tests were calculated. The sensitivity of the tests based on C6-peptides derived from *B. burgdorferi* s.s. or *B. garinii* were 100 % for *B. burgdorferi* s.s. N40, *B. garinii* PBi or for *B. afzelii* PKo-specific antibodies. In contrast, C6-peptides derived from *B. afzelii* were able to detect only antibodies against *B. afzelii* PKo in all infected mice. In general, antibodies against the isolate *B. afzelii* Slovakia were detected with a lesser efficiency than antibodies against *B. afzelii* PKo with each single C6-peptide used in the study. This indicates that strain- or isolate-specific C6-antibodies may be induced during infection. The assessment of the 27 C6 antibody positive canine sera showed that the majority of the samples reacted with C6 peptides derived from *B. burgdorferi* s.s.- and *B. garinii*-C6 exclusively.

The applicability of C6-peptide as a rapid, highly-specific, serologic marker for infection in dogs from Germany could be confirmed. However, it can neither substitute a detailed anamnestic report nor can it completely replace the two-tiered-test system currently recommend for specific antibody detection. Its use as a marker to monitor therapeutic success for treatment of Lyme borreliosis is only given within defined conditions. The diverging sensitivities of different C6-peptides against antibodies from European *Borrelia* species and isolates clearly show the necessity of further intense research in order to establish a sensitive C6 test system, which will meet the demands that arise in the European environment.

## 8 Literaturverzeichnis

Aberer E, Breier F, Stanek G, Schmidt B. Success and failure in treatment of acrodermatitis chronica atrophicans. *Infection* 1996;24(1):85-7.

Amore G, Tomassone L, Grego E, Ragagli C, Bertolotti L, Nebbia P, et al. *Borrelia lusitaniae* in immature *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) feeding on common wall lizards in Tuscany, central Italy 2. *J Med Entomol* 2007 Mar;44(2):303-7.

Anon. Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. In: Coico RE, editor. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley Sons Inc.; 1993.

Anon. Vet Med Labor. Vet Med Update: Infiziert oder nicht infiziert? Die neue C6-Technologie für mehr Effizienz in der Borreliose-Diagnostik bei Hunden. Zitiert vom 05.01.2009 Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories.

<http://www.idexx.de/tiergesundheitslabor/c6/d1440108.pdf>

Appel MJG. Lyme disease in dogs and cats. *Compend Cont Educ Pract Vet* 1990;12:617-26.

Appel MJG, Allen S, Jacobson RH, Lauderdale T-L, Chang Y-F, Shin SJ, et al. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis* 1993;167:651-64.

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD, Jr., Philipp MT, Steere AC, et al. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J Infect Dis* 2003 Apr 15;187(8):1187-99.

Baranton G, Postic D, Saint G, I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992 Jul;42(3):378-83.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes 5. *Yale J Biol Med* 1984 Jul;57(4):521-5.

Barbour AG. Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species 6. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:155-71.

Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species 2. *Microbiol Rev* 1986 Dec;50(4):381-400.

Barthold SW. Specificity of infection-induced immunity among *Borrelia burgdorferi* sensu lato species

1. Infect Immun 1999 Jan;67(1):36-42.

Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany

2. J Clin Microbiol 1999 Nov;37(11):3448-51.

Benach JL, Fleit HB, Habicht GS, Coleman JL, Bosler EM, Lane BP. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor

2. J Infect Dis 1984 Oct;150(4):497-507.

Brown RN, Lane RS. Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* 166. Science 1992;256:1439-42.

Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi* 1. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992 Mar;11(3):224-32.

Burchill MA, Nardelli DT, England DM, DeCoster DJ, Christopherson JA, Callister SM, et al. Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with *Borrelia burgdorferi* 2. Infect Immun 2003 Jun;71(6):3437-42.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science 1982 Jun 18;216(4552):1317-9.

Burgess EC. Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi* 1395. Am J Vet Res 1992 Sep;53(9):1507-11.

Burman N, Bergstrom S, Restrepo BI, Barbour AG. The variable antigens Vmp7 and Vmp21 of the relapsing fever bacterium *Borrelia hermsii* are structurally analogous to the VSG proteins of the African trypanosome 2. Mol Microbiol 1990 Oct;4(10):1715-26.

Carvalho de I, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, et al. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection

2. Clin Rheumatol 2008 Dec;27(12):1587-91.

Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, et al. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to *Ixodid* ticks. Vet Pathol 2000;37(1):68-76.

Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes 1. Annu Rev Genet 2002; 36:47-73.

Chu CY, Liu W, Jiang BG, Wang DM, Jiang WJ, Zhao QM, et al. A Novel Genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Rodents and Ticks of Southwestern China

2. J Clin Microbiol 2008 Jul 9.

Cohen D, Bosler EM, Bernard W, Meirs D, Eisner R, Schulze T. Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. Ann N Y Acad Sci 1988;539:244-57.

Cohen ND, Cohen D. Borreliosis in horses: a comparative review. Compend Cont Educ Pract Vet 1990;12:1449-58.

Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, et al. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. J Clin Microbiol 2004 Mar;42(3):1316-8.

Coutte L, Botkin DJ, Gao L, Norris SJ. Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection

1. PLoS Pathog 2009 Feb;5(2):e1000293.

Craft JE, Grodzicki RL, Shrestha M, Fischer DK, Garcia-Blanco M, Steere AC. The antibody response in Lyme disease

1. Yale J Biol Med 1984a Jul;57(4):561-5.

Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests

3. J Infect Dis 1984b May;149(5):789-95.

Craig-Mylius KA, Lee M, Jones KL, Glickstein LJ. Arthritogenicity of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*: comparison of infection in mice

1. Am J Trop Med Hyg 2009 Feb;80(2):252-8.

Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes

2. FEMS Microbiol Rev 2004 Jun;28(3):291-318.

Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987- 1992). Vet Pathol 1997;34:85-96.

Dennehy PH. Active immunization in the United States: developments over the past decade

5. Clin Microbiol Rev 2001 Oct;14(4):872-908, table.

Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid

12. Emerg Infect Dis 2004 Sep;10(9):1692-3.



Dorward DW, Schwan TG, Garon CF. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans

1. J Clin Microbiol 1991 Jun;29(6):1162-70.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*

1. Int J Syst Evol Microbiol 2001 Nov;51(Pt 6):2145-65.

Eicken C, Sharma V, Klabunde T, Lawrenz MB, Hardham JM, Norris SJ, et al. Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. J Biol Chem 2002 Jun 14;277(24):21691-6.

Embers ME, Jacobs MB, Johnson BJ, Philipp MT. Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule

2. Clin Vaccine Immunol 2007a Aug;14(8):931-6.

Embers ME, Jacobs MB, Johnson BJ, Philipp MT. The C6 Diagnostic Peptide of *Borrelia burgdorferi* Contains Dominant Epitopes That Are Largely Inaccessible to Antibody on the Parent VlsE Molecule

1. Clin Vaccine Immunol 2007b Jun 13.

Embers ME, Liang FT, Howell JK, Jacobs MB, Purcell JE, Norris SJ, et al. Antigenicity and recombination of VlsE, the antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*, in rabbits, a host putatively resistant to long-term infection with this spirochete

1. FEMS Immunol Med Microbiol 2007c Aug;50(3):421-9.

Fikrig E, Narasimhan S. *Borrelia burgdorferi*--traveling incognito? Microbes Infect 2006 Apr;8(5):1390-9.

Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B. Epidemiological aspects of human granulocytic Ehrlichiosis in southern Germany

1. Wien Klin Wochenschr 1999 Dec 10;111(22-23):1000-4.

Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljic E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, et al. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov

2. Int J Med Microbiol 2007 Jul 4.

Fleming RV, Marques AR, Klempner MS, Schmid CH, Dally LG, Martin DS, et al. Pre-treatment and post-treatment assessment of the C<sub>6</sub> test in patients with persistent symptoms and a history of Lyme borreliosis

161. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004 Aug;23(8):615-8.

Foldvari G, Farkas R, Lakos A. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. Emerg Infect Dis 2005 Nov;11(11):1794-5.

Franca I, Santos L, Mesquita T, Collares-Pereira M, Baptista S, Vieira L, et al. Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. Wien Klin Wochenschr 2005 Jun;117(11-12):429-32.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997 Dec 11;390(6660):580-6.

Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor

1. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Dec 20;91(26):12594-8.

Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: A possible breed predisposition

1. BMC Vet Res 2007 Jul 12;3(1):15.

Gern L, Hu CM, Voet P, Hauser P, Lobet Y. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*. Vaccine 1997 Oct;15(14):1551-7.

Gibson MD, Omran MT, Young CR. Experimental feline Lyme borreliosis as a model for testing *Borrelia burgdorferi* vaccines

1394. Adv Exp Med Biol 1995;383:73-82.

Gomes-Solecki MJ, Meirelles L, Glass J, Dattwyler RJ. Epitope length, genospecies dependency, and serum panel effect in the IR6 enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi*

1. Clin Vaccine Immunol 2007 Jul;14(7):875-9.

Gottner G, Schulte-Spechtel U, Wilske B. Heterogeneity of the immunodominant surface protein VlsE among the three genospecies of *Borrelia burgdorferi* pathogenic for humans

4. Int J Med Microbiol 2004 Apr;293 Suppl 37:172-3.

- Gradmann C. Alles eine Frage der Methode. Zur Historizität der Kochschen Postulate 1840-2000. *Medizinhistorisches Journal* 2008;43:121-48.
- Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G. Lyme borreliosis; biology, epidemiology and control. Oxon: CABI Publishing; 2002.
- Greene CE, Straubinger RK. Borreliosis. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier Company; 2006. p. 417-35.
- Greig B, Armstrong PJ. Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (*A. phagocytophilum*). In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Company; 2006. p. 219-24.
- Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, et al. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Mar 2;101(9):3142-7.
- Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo. *APMIS* 2001;109(5):383-8.
- Halperin JJ. Nervous system Lyme disease  
43. *Infect Dis Clin North Am* 2008 Jun;22(2):261-74, vi.
- Hammer B, Moter A, Kahl O, Alberti G, Gobel UB. Visualization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by fluorescence in situ hybridization (FISH) on whole-body sections of Ixodes ricinus ticks and gerbil skin biopsies  
28. *Microbiology* 2001 Jun;147(Pt 6):1425-36.
- Haupt K, Kraiczy P, Wallich R, Brade V, Skerka C, Zipfel PF. Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelian complement regulator-acquiring surface proteins  
3. *J Infect Dis* 2007 Jul 1;196(1):124-33.
- Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1997 Jun;35(6):1433-44.
- Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 Jul;5(4):456-62.

Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 1999 Jul;37(7):2241-7.

Hinnebusch BJ, Barbour AG, Restrepo BI, Schwan TG. Population structure of the relapsing fever spirochete *Borrelia hermsii* as indicated by polymorphism of two multigene families that encode immunogenic outer surface lipoproteins  
13. Infect Immun 1998 Feb;66(2):432-40.

Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, et al. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2  
1. J Immunol 1999 Sep 1;163(5):2382-6.

Hovius KE, Stark LA, Bleumink-Pluym NM, van dP, I, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema SG, et al. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. Vet Q 1999 Apr;21(2):54-8.

Hu LT, Klempner MS. Host-pathogen interactions in the immunopathogenesis of Lyme disease  
2. J Clin Immunol 1997 Sep;17(5):354-65.

Hubalek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. Eur J Epidemiol 1997 Dec;13(8):951-7.

Hubalek Z, Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe  
114. Parasitol Res 1998;84(3):167-72.

Humair PF. Birds and *Borrelia*  
2. Int J Med Microbiol 2002 Jun;291 Suppl 33:70-4.

Indest KJ, Howell JK, Jacobs MB, Scholl-Meeker D, Norris SJ, Philipp MT. Analysis of *Borrelia burgdorferi* vlsE gene expression and recombination in the tick vector. Infect Immun 2001 Nov;69(11):7083-90.

Iyer R, Hardham JM, Wormser GP, Schwartz I, Norris SJ. Conservation and heterogeneity of vlsE among human and tick isolates of *Borrelia burgdorferi*  
14. Infect Immun 2000 Mar;68(3):1714-8.

Jobe DA, Lovrich SD, Asp KE, Mathiason MA, Albrecht SE, Schell RF, et al. Significantly improved accuracy of diagnosis of early Lyme disease by peptide enzyme-linked immunosorbent assay based

on the borreliacidal antibody epitope of *Borrelia burgdorferi* OspC

5. Clin Vaccine Immunol 2008 Jun;15(6):981-5.

Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM. Taxonomy of the Lyme disease spirochetes

7. Yale J Biol Med 1984 Jul;57(4):529-37.

Kamradt T. Lyme disease and current aspects of immunization

10. Arthritis Res 2002;4(1):20-9.

Kang I, Barthold SW, Persing DH, Bockenstedt LK. T-helper-cell cytokines in the early evolution of murine Lyme arthritis

5. Infect Immun 1997 Aug;65(8):3107-11.

Knauer J. Untersuchungen zur Dissemination von *Borrelia burgdorferi* sowie zur Induktion der Immunantwort zu Beginn der Lyme-Borreliose im murinen Modell (Dissertation rer.nat.).Dresden: Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaft der Technischen Universität Dresden; 2006.

Knauer J, Siegemund S, Muller U, Al-Robaïy S, Kastelein RA, Alber G, et al. *Borrelia burgdorferi* potently activates bone marrow-derived conventional dendritic cells for production of IL-23 required for IL-17 release by T cells

1. FEMS Immunol Med Microbiol 2007 Apr;49(3):353-63.

Kochi SK, Johnson RC, Dalmasso AP. Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Role of antibody in formation of an effective membrane attack complex

1. J Immunol 1991 Jun 1;146(11):3964-70.

Kotloski NJ, Nardelli DT, Peterson SH, Torrealba JR, Warner TF, Callister SM, et al. Interleukin-23 is required for development of arthritis in mice vaccinated and challenged with *Borrelia* species

2. Clin Vaccine Immunol 2008 Aug;15(8):1199-207.

Krupka I, Pantchev N, Weise M, Straubinger RK. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden:

Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. Praktischer Tierarzt 2007;10(88):776-87.

Kudryashev M, Cyrklaff M, Baumeister W, Simon MM, Wallich R, Frischknecht F. Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes

1. Mol Microbiol 2009 Feb 4.

Labandeira-Rey M, Seshu J, Skare JT. The absence of linear plasmid 25 or 28-1 of *Borrelia burgdorferi* dramatically alters the kinetics of experimental infection via distinct mechanisms  
1. Infect Immun 2003 Aug;71(8):4608-13.

Labandeira-Rey M, Skare JT. Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1  
5. Infect Immun 2001 Jan;69(1):446-55.

Lazarus JJ, Kay MA, McCarter AL, Wooten RM. Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages  
1. Infect Immun 2008 Mar;76(3):1153-62.

Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. Vet Ther 2002a;3(3):308-15.

Levy SA. Use of a C6 ELISA test to evaluate the efficacy of a whole-cell bacterin for the prevention of naturally transmitted canine *Borrelia burgdorferi* infection. Vet Ther 2002b;3(4):420-4.

Levy SA, Duray PH. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. J Vet Intern Med 1988 Jul;2(3):138-44.

Levy SA, Magnarelli LA. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis  
69. J Am Vet Med Assoc 1992 Feb 1;200(3):344-7.

Levy SA, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P, Lorentzen L, Dimarco AA. Quantitative measurement of C6 antibody following antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* antibody-positive nonclinical dogs  
1. Clin Vaccine Immunol 2008 Jan;15(1):115-9.

Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, et al. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL  
6. J Infect Dis 2000a Nov;182(5):1455-62.

Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT. An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*  
11. J Immunol 1999a Nov 15;163(10):5566-73.

- Liang FT, Jacobs MB, Bowers LC, Philipp MT. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis  
3. J Exp Med 2002 Feb 18;195(4):415-22.
- Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay  
5. J Clin Microbiol 2000b Nov;38(11):4160-6.
- Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*  
9. Infect Immun 1999b Dec;67(12):6702-6.
- Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJ, Miller JN, Philipp MT. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* vlsE  
10. J Clin Microbiol 1999c Dec;37(12):3990-6.
- Lipsker D. Dermatological aspects of Lyme borreliosis. Med Mal Infect 2007 Jul;37(7-8):540-7.
- Ljostad U, Henriksen TH. Management of neuroborreliosis in European adult patients  
35. Acta Neurol Scand Suppl 2008;188:22-8.
- Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Successful treatment of Lyme encephalopathy with intravenous ceftriaxone. J Infect Dis 1999 Aug;180(2):377-83.
- Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den BL, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, et al. IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis  
2. J Immunol 2001 Jul 15;167(2):1004-13.
- Ludwig M, Euzeby J, Whitman WB. Draft Taxonomic Outline of the *Bacteroides*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Dictyoglomi*, and *Gemmatimonadetes*. Bergeys Taxonomic Outlines Volume 4 4. 2008. Zitiert vom 03.01. 2009. [http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys\\_Vol\\_4\\_Outline.pdf](http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_4_Outline.pdf)
- Lusitani D, Malawista SE, Montgomery RR. *Borrelia burgdorferi* are susceptible to killing by a variety of human polymorphonuclear leukocyte components  
6. J Infect Dis 2002 Mar 15;185(6):797-804.

Magnarelli L, Fikrig E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in naturally infected horses in the USA by enzyme-linked immunosorbent assay using whole-cell and recombinant antigens. Res Vet Sci 2005 Oct;79(2):99-103.

Magnarelli LA, Anderson JF. Early detection and persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in persons with Lyme disease. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1987 Feb;263(3):392-9.

Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. Am J Epidemiol 1988 Apr;127(4):818-25.

Magnarelli LA, Flavell RA, Padula SJ, Anderson JF, Fikrig E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 1997 Jan;35(1):169-73.

Marangoni A, Moroni A, Accardo S, Cevenini R. *Borrelia burgdorferi* VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis

12. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008 May;27(5):349-54.

Masuzawa T, Fukui T, Miyake M, Oh HB, Cho MK, Chang WH, et al. Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from Ixodes nipponensis in Korea as *Borrelia valaisiana*

1. Int J Syst Bacteriol 1999 Oct;49 Pt 4:1409-15.

Masuzawa T, Hashimoto N, Kudeken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, et al. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan

14. J Med Microbiol 2004 May;53(Pt 5):421-6.

McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway

31. Trends Immunol 2006 Jan;27(1):17-23.

McLain DK, Wesson DM, Oliver JH, Jr., Collins FH. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1995 May;32(3):353-60.

Montgomery RR, Lusitani D, de Boisfleury CA, Malawista SE. Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*

3. J Infect Dis 2002 Jun 15;185(12):1773-9.

Moody K, Barthold SW, Terwilliger GA, Beck DS, Hansen GM, Jacoby RO. Experimental chronic Lyme borreliosis in Lewis rats. Am J Trop Med Hyg 1990;42:165-74.

Moody KD, Barthold SW. Animal models of human disease: Lyme borreliosis in laboratory mice

305. Comp Pathol Bull 1995;4-6.



- Moody KD, Barthold SW. Lyme borreliosis in laboratory mice  
3. Lab Anim Sci 1998 Apr;48(2):168-71.
- Moody KD, Terwilliger GA, Hansen GM, Barthold SW. Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in *Peromyscus leucopus*  
514. J Wildlife Dis 1994;30(2):155-61.
- Muller I, Khanakah G, Kundi M, Stanek G. Horses and *Borrelia*: immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish Riding School in Vienna  
25. Int J Med Microbiol 2002 Jun;291 Suppl 33:80-7.
- Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, Falco RC, Freeman K, McKenna D, et al. Prophylaxis with single-dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. N Engl J Med 2001 Jul 12;345(2):79-84.
- Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis  
3. Lancet 1998 Aug 15;352(9127):557-65.
- Nefedova VV, Korenberg EI, Gorelova NB, Kovalevskii YV. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*  
1. Folia Parasitol (Praha) 2004 Mar;51(1):67-71.
- Norris SJ, Howell JK, Garza SA, Ferdows MS, Barbour AG. High- and low-infectivity phenotypes of clonal populations of in vitro-cultured *Borrelia burgdorferi*  
4. Infect Immun 1995 Jun;63(6):2206-12.
- O'Connor TP, Esty KJ, Hanscom JL, Shields P, Philipp MT. Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Clin Diagn Lab Immunol 2004 May;11(3):458-62.
- Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Jan 16;98(2):670-5.
- Ohnishi J, Schneider B, Messer WB, Piesman J, de Silva AM. Genetic variation at the vlsE locus of *Borrelia burgdorferi* within ticks and mice over the course of a single transmission cycle  
3. J Bacteriol 2003 Aug;185(15):4432-41.
- Pachner AR, Delaney E, O'Neill T, Major E. Inoculation of non-human primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. Neurology 1995;45:165-72.

- Pahl A, Kühlbrandt U, Brune K, Röllinghoff M, Gessner A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. J Clin Microbiol 1999;37(6):1958-63.
- Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, et al. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. J Clin Invest 2000 Aug;106(4):561-9.
- Pal U, Montgomery RR, Lusitani D, Voet P, Weynants V, Malawista SE, et al. Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. J Immunol 2001 Jun 15;166(12):7398-403.
- Parker JL, White KK. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. Cornell Vet 1992;82:253-74.
- Patrican LA. Absence of Lyme disease spirochetes in larval progeny of naturally infected *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1997;34(1):52-5.
- Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, et al. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. J Infect Dis 2001 Oct 1;184(7):870-8.
- Philipp MT, Marques AR, Fawcett PT, Dally LG, Martin DS. C6 test as an indicator of therapy outcome for patients with localized or disseminated lyme borreliosis  
3. J Clin Microbiol 2003 Nov; 41(11):4955-60.
- Philipp MT, Wormser GP, Marques AR, Bittker S, Martin DS, Nowakowski J, et al. A decline in C6 antibody titer occurs in successfully treated patients with culture-confirmed early localized or early disseminated Lyme Borreliosis  
1. Clin Diagn Lab Immunol 2005 Sep; 12(9):1069-74.
- Piesman J, Dolan MC, Happ CM, Luft BJ, Rooney SE, Mather TN, et al. Duration of immunity to reinfection with tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* in naturally infected mice. Infect Immun 1997;65(10):4043-7.
- Postic D, Garnier M, Baranton G. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates--description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2  
3. Int J Med Microbiol 2007 Jul; 297(4):263-71.
- Puius YA, Kalish RA. Lyme arthritis: pathogenesis, clinical presentation, and management  
20. Infect Dis Clin North Am 2008 Jun;22(2):289-vii.

Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis. Appl Environ Microbiol 2005 Nov;71(11):7203-16.

Richter D. Modulatory effect of cattle on risk for lyme disease. 2006a Dec.

Richter D, Matuschka FR. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. Appl Environ Microbiol 2006b Jul;72(7):4627-32.

Richter D, Schlee DB, Allgower R, Matuschka FR. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp nov., with its hosts in central Europe. Applied and Environmental Microbiology 2004 Nov;70(11):6414-9.

Richter D, Schlee DB, Matuschka FR. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent

29. Emerg Infect Dis 2003 Jun;9(6):697-701.

Rosa PA, Schwan TG. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J Infect Dis 1989 Dec; 160(6):1018-29.

Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr. *Borrelia carolinensis* sp.nov. - a new (14th) member of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern United States 3. J Clin Microbiol 2008 Nov 19.

Saito K, Ito T, Asashima N, Ohno M, Nagai R, Fujita H, et al. Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries

2. Am J Trop Med Hyg 2007 Dec;77(6):1124-7.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Schmidli J, Hunziker T, Moesli P, Schaad UB. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of fascial palsy due to Lyme borreliosis (letter). J Infect Dis 1988;158:905-6.

Schroder NW, Eckert J, Stubbs G, Schumann RR. Immune responses induced by spirochetal outer membrane lipoproteins and glycolipids

1. Immunobiology 2008;213(3-4):329-40.

Schuijt TJ, Hovius JW, van Burgel ND, Ramamoorthi N, Fikrig E, van Dam AP. Salp15 inhibits the killing of serum sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates

1. Infect Immun 2008 Apr 21.

Schwan T, Burgdorfer W, Rosa P. Borrelia. In: Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. Washington DC: American Society of Microbiology; 1995a. p. 626-35.

Schwan TG, Burgdorfer W, Garon CF. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation  
104. Infect Immun 1988 Aug;56(8):1831-6.

Schwan TG, Piesman A, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proc Natl Acad Sci 1995b;92(7):2909-13.

Shin SJ, Chang YF, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale TL, Appel MJ, et al. Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. Vet Microbiol 1993 Jul;36(1-2):161-74.

Sillanpaa H, Lahdenne P, Sarvas H, Arnez M, Steere A, Peltomaa M, et al. Immune responses to borrelial VlsE IR6 peptide variants  
2. Int J Med Microbiol 2007 Feb;297(1):45-52.

Smith RP, Jr., Rand PW, Lacombe EH, Morris SR, Holmes DW, Caporale DA. Role of bird migration in the long-distance dispersal of *Ixodes dammini*, the vector of Lyme disease  
8. J Infect Dis 1996 Jul;174(1):221-4.

Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 2001a Jul 12;345(2):115-25.

Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, et al. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease  
1. Ann Intern Med 1980 Jul;93(1):8-16.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease  
4. J Clin Invest 2004 Apr;113(8):1093-101.

Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, et al. The spirochetal etiology of Lyme disease. N Engl J Med 1983 Mar 31;308(13):733-40.

Steere AC, Gross D, Meyer AL, Huber BT. Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. J Autoimmun 2001b May;16(3):263-8.

Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum  
2. Ann Intern Med 1977a Jun;86(6):685-98.

- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, et al. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities  
3. Arthritis Rheum 1977b Jan;20(1):7-17.
- Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for lyme disease  
6. Clin Infect Dis 2008 Jul 15;47(2):188-95.
- Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. J Clin Microbiol 2000a Jun;38(6):2191-9.
- Straubinger RK, Dharma RT, Davidson E, Summers BA, Jacobson RH, Frey AB. Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. Vaccine 2001 Oct 12;20(1-2):181-93.
- Straubinger RK, Straubinger AF, Harter L, Jacobson RH, Chang YF, Summers BA, et al. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. Infect Immun 1997a Apr;65(4):1273-85.
- Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH. Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. J Infect Dis 2000b Mar;181(3):1069-81.
- Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH, Erb HN. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. Wien Klin Wochenschr 1998 Dec 23;110(24):874-81.
- Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. J Clin Microbiol 1997b Jan;35(1):111-6.
- Tabuchi N, Mitani H, Seino S, Fukunaga M. The 44-kb linear plasmid molecule in the relapsing fever agent *Borrelia duttonii* strain Ly serve as a preservation of vmp genes  
6. Microbiol Immunol 2002;46(3):159-65.
- Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*  
14. Infect Immun 1987 Sep;55(9):2311-3.
- Taragel'ova V, Koci J, Hanincova K, Kurtenbach K, Derdakova M, Ogden NH, et al. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe  
1. Appl Environ Microbiol 2008 Feb;74(4):1289-93.

Templeton TJ. *Borrelia* outer membrane surface proteins and transmission through the tick. J Exp Med 2004 Mar 1;199(5):603-6.

Thomas V, Anguita J, Samanta S, Rosa PA, Stewart P, Barthold SW, et al. Dissociation of infectivity and pathogenicity in *Borrelia burgdorferi*  
1. Infect Immun 2001 May;69(5):3507-9.

Tjernberg I, Schon T, Ernerudh J, Wistedt AC, Forsberg P, Eliasson I. C6-peptide serology as diagnostic tool in neuroborreliosis  
9. APMIS 2008 May;116(5):393-9.

Tjernberg I, Sillanpaa H, Seppala I, Eliasson I, Forsberg P, Lahdenne P. Antibody responses to borrelia IR(6) peptide variants and the C6 peptide in Swedish patients with erythema migrans  
1. Int J Med Microbiol 2009 Jan 8.

Toepfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules  
3. Vaccine 2007 Jan 4;25(2):314-26.

Töpfer KH. Charakterisierung der humoralen Immunantwort im Hund nach Impfung mit verschiedenen Impfstoffen gegen den Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, unter Berücksichtigung zweier verschiedener Impfstrategien (Dissertation med.vet.) Leipzig: Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig; 2005.

Tuomi J, Rantamäki LK, Tanskanen R. Experimental infection of cattle with several *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains; immunological heterogeneity of strains as revealed in serological tests. Vet Microbiol 1997;60:27-43.

Ungemach FR. Mittel zur Bekämpfung von Ektoparasiten. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R, editors. Pharmaokotherapie bei Haus- und Nutztieren. Berlin: Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG; 2006. p. 312-31.

Van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, De Jongh BM, Spanjaard L, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clinical Infectious Diseases 1993;17:708-17.

Vianello M, Marchiori G, Giometto B. Multiple cranial nerve involvement in Bannwarth's syndrome  
39. Neurol Sci 2008 Apr;29(2):109-12.

- Wang D, Botkin DJ, Norris SJ. Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI 5. Mol Microbiol 2003 Mar;47(5):1407-17.
- Wang G, van Dam AP, Dankert J. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolate from a patient with lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1999a Sep;37(9):3025-8.
- Wang G, van Dam AP, Dankert J. Analysis of a VMP-like sequence (vls) locus in *Borrelia garinii* and Vls homologues among four *Borrelia burgdorferi sensu lato* species. FEMS Microbiol Lett 2001 May 15;199(1):39-45.
- Wang G, van Dam AP, Le FA, Postic D, Peter O, Baranton G, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). Int J Syst Bacteriol 1997 Oct;47(4):926-32.
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1999b Oct;12(4):633-53.
- Wang TJ, Sangha O, Phillips CB, Wright EA, Lew RA, Fossel AH, et al. Outcomes of children treated for Lyme disease. J Rheumatol 1998;25(11):2249-53.
- Weber K, Schierz G, Wilske B, Preac-Mursic V. Lymphocytoma-a borreliosis? Z Hautkr 1985 Oct 15;60(20):1585-98.
- Weinstein A. Editorial commentary: laboratory testing for Lyme disease: time for a change? 5. Clin Infect Dis 2008 Jul 15;47(2):196-7.
- Wilske B. Diagnosis of lyme borreliosis in europe. Vector Borne Zoonotic Dis 2003;3(4):215-27.
- Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rossler D, et al. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from patients with neuroborreliosis in Germany 6. Med Microbiol Immunol 1996a Feb;184(4):195-201.
- Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke F, Preac-Mursic V, Rössler D, et al. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implication for *Borrelia* vaccine development. Infection 1996b;24(2):208-12.
- Wilske B, Fingerle V, Preac-Mursic V, Jauris-Heipke S, Hofmann A, Loy H, et al. Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* 4. Med Microbiol Immunol 1994 Feb;183(1):43-59.

Wormser GP, Liveris D, Hanincova K, Brisson D, Ludin S, Stracuzzi VJ, et al. Effect of *Borrelia burgdorferi* genotype on the sensitivity of C6 and 2-tier testing in North American patients with culture-confirmed Lyme disease

2. Clin Infect Dis 2008 Oct 1;47(7):910-4.

Yu LP, Jr., Smith GN, Jr., Brandt KD, Myers SL, O'Connor BL, Brandt DA. Reduction of the severity of canine osteoarthritis by prophylactic treatment with oral doxycycline. Arthritis Rheum 1992 Oct;35(10):1150-9.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. Cell 1997 Apr 18;89(2):275-85.

Zhang JR, Norris SJ. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene vlsE involves cassette-specific, segmental gene conversion

1. Infect Immun 1998a Aug;66(8):3698-704.

Zhang JR, Norris SJ. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*

1. Infect Immun 1998b Aug;66(8):3689-97.



## **I Anhang Tabellen**

Tabelle E1: Reagenzien und Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
Acrylamid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	A3574
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	15510-027
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	A0171
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	A3678
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	M7522
Borsäure	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe	5935.1
Bovines Serumalbumin (BSA) (für BSK-II Medium) Lot: K01106-2010	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	K35-011
Bovines Serumalbumin (BSA) 35 % (für MKP Medium) Lot: K8915	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	A-7409076
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	120K3736
BSK-H Medium Lot:K2327	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	B3528
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	C1016
Chloroform	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	C2432
CMRL Medium 1066 10 ×	Gibco <sup>®</sup> , Invitrogen <sup>™</sup> , Karlsruhe	21540 026
dNTP Mix /dTTP	Applied Biosystems, Apperla GmbH, Darmstadt	N8080261
EDTA	Merck, VWR <sup>™</sup> International, Darmstadt	1.08454. 0250
Essigsäure 100 % (Eisessig)	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe	3738.2
Ethanol 99,8 %, vergällt	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe	K928.3
Ethanol 99,8 % (HPLC)	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe	P076.2
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	E1510
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	A 11-101
Bovine Gelatine	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	G9391
Gelatine (Schwein)	Merck,	VM602970 610
Glyzerol	VWR <sup>™</sup> International, Darmstadt	2339003
D+-Glukose	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	G6152
Glyzin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	23390 02
Hepes	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	H3784
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe	7343.2
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	I9392
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	P9333
Kanamycin 10 mg/ml	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , Taufkirchen	K0918

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Vetrieb</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
Kaninchenserum	Gibco™, Invitrogen™, Karlsruhe	16120-107
Magermilchpulver	VWR™ International	A0830. 0500
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	M2643
Methanol	Carl Roth®, Karlsruhe	4627.5
N-Acetyl-D-Glucosamin	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	A3286
Natriumazid	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	S8032
Natriumacetat	Fluka, Sigma-Aldrich®	7180
Natriumkarbonat	Carl Roth®, Karlsruhe	8563.1
Natriumchlorid	Carl Roth®, Karlsruhe	3957.1
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth®, Karlsruhe	HN01.1
Natriumhydrogenphosphat	Diagonal GmbH, Münster	A3599.0500
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	A98654.56
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	P4562
Neopepton	BD, Heidelberg	211681
Phenol (Roti-Phenol®)	Carl Roth®, Karlsruhe	0038.2
Rekombitek® Lyme Borrelia burgdorferi Bacterial Extract (rekombinantes OspA)	Merial Inc., Athens, GA, USA	42110B
Rifampicin	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	R7382
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva™, BD Heidelberg	15733
TC-Hefeextrakt	Bacto™, BD Heidelberg	255772
TEMED	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	T9281
TMB2-C Microwell Substrate, 2 Component	Medac GmbH, Wedel	50-76-00
Tris Base	Carl Roth®, Karlsruhe	A4112
Tween® 20	VWR™ International, Darmstadt	8.221.840.500
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth®, Karlsruhe	8070.2
4-Chloro-1Naphtol (Opti-4-CN)	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	C6788
0, 9 % Natriumchlorid, Phys. Kochsalzlösung	B Braun AG, Melsungen	0082489E

Tabelle E2: Antikörper

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
Anti-Dog-IgG-AP	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	A0793
Anti-Dog-IgG-HRP Lot 04626	MP Biomedicals, Heidelberg	55416
Goat-Anti-Mouse-IgG-AP Lot: 20151	Rockland Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, USA BioTrend GmbH, Köln	610-1502
Goat-Anti-Mouse-IgG-HRP Lot: FIM03, FIM11, FEH10	R&D Systems, Wiesbaden	HAF007

Tabelle E3: Enzyme

Name	Hersteller/Vertrieb	Bestell-Nr.
DNA Taq Gold Polymerase AmpliTaQ Gold + Gold Buffer+ MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, Apperla GmbH, Darmstadt	4311806
Precision Strep-Tactin	Bio-Rad, München	161-0380
Proteinase K	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen	P2308

Tabelle E4: Protein- und DNA-Gewichtsstandards

Name	Hersteller/Vertrieb	Bestell-Nr.
Precision Plus Protein unstained	Bio-Rad, München	161-0363
Biotinylierter SDS-Page Standard	Bio-Rad, München	161-0373
Gene Ruler 100bp DNA Ladder (für PCR-Gel)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0248

Tabelle E5: Narkosemittel

Name	Hersteller/Vertrieb	
Ketavet (Ketaminhydrochlorid 10 %)	Pfizer Pharma GmbH, Berlin	Charge: 61809-11
Xylazin 2 % (Xylazinhydrochlorid 2 %)	Albrecht GmbH, Aulendorf	Charge: 131 A1

Tabelle E6: Kommerzielle Testsysteme

Name	Hersteller/Vertrieb	Bestell-Nr.
BCA Protein Assay<	Pierce, USA, Perbio, Bonn	23225
<i>Borrelia afzelii</i> +VlsE Eco Blot IgG Western-Blot	Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim	WE023G90
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden	69504
Lyme Quant C <sub>6</sub> Test®	IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA	Nur zu Forschungs- zwecken FLI:-B-399
4Dx SNAP® Test	IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA	Nur zu Forschungs- zwecken

Tabelle E7: Materialien für die Sterilfiltration

Name	Hersteller/Vertrieb	Bestellnr.
Glass Microfibre Filter 1,6 µm	Whatman/VWR™ International, Darmstadt	513-5205
Bottle Top Filter 0,45 µm	Nalgene/ VWR™ International, Darmstadt	734-5064
Bottle Top Filter 0,20 µm	Nalgene/ VWR™ International, Darmstadt	734-5063

Tabelle E8: Materialien für die Serologie und Molekularbiologie

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>	<b>Bestellnr.</b>
96C- Maxisorb ELISA-Platten	Nunc GmbH Co KG, Wiesbaden	430341
Nitrocellulosemembran 3 mm, 45 µm	membraPure, Bodenheim	305-0005
96-Well-qPCR Platten Thermo Fast 96	Thermo Fisher Scientific, <i>AB. gariniene</i> , Hamburg	AB-1170
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg	0030 121.023
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg	0030 121.023

Tabelle E9: Materialien für die Blutentnahmen, Injektionen und Serumaufbewahrung

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>	<b>Bestell-Nr.</b>
Monovetten (9 ml)	Heiland MED, Hamburg	371-385
Kanülen 20 G (0,9 mm)	Terumo /Heiland MED, Hamburg	370-390
Kanülen 26 G (0,45 mm)	Sterican/ Heiland MED, Hamburg	370-280
Tuberkulinspritzen (1 ml)	B. Braun/Heiland MED, Hamburg	370-155
Serumseparatoren 1,0 ml	BD Microtainer, Franklin Alkes, USA	365956
2 ml Apex Tubes	Alpha Laboratories, Hampshire, UK	CP5518
Apex Screw Caps (Deckel mit Dichtungsring)	Alpha Laboratories, Hampshire, UK	CP5525

Tabelle E10: Geräte

Brutschrank	Thermo Forma, Marietta, USA
ELISA- UltraWASH Plus UWA1756 <sup>TM</sup>	DYNEX Technologies Inc., USA
ELISA-Spektrometer Spectra Max 340 <sup>TM</sup>	Molecular Devices, München
iCycler iQ <sup>TM</sup> Multi-Color	BioRad München
Mikroskope:	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
Axiolab	Carl Zeiss, Jena
BioPhotometer Plus	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter ino-Lab <sup>®</sup> Level 2	WTW GmbH, Weilheim
Schüttelinkubator: GLF 3031	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sterilwerkbank HERA-Safe	Heraeus, Osterode
Ultraschall: Bandelin Sonoplus UW2070	Bandelin electronic, Berlin
Brutschrank	Thermo Forma, Marietta, USA
ELISA- UltraWASH Plus UWA1756 <sup>TM</sup>	DYNEX Technologies Inc., USA
ELISA-Spektrometer Spectra Max 340 <sup>TM</sup>	Molecular Devices, München
iCycler iQ <sup>TM</sup> Multi-Color	BioRad München
Mikroskope:	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
Axiolab	Carl Zeiss, Jena
Zentrifugen:	
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Osterode
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Western-Blot:	
TE Series-Transphor- Electrophoresis-Unit	Hoefler, San Francisco, USA
SE 600 Series-Electrophoresis- Unit	Hoefler, San Francisco, USA
Miniblotter <sup>®</sup>	Immunetics, Boston, USA
Mini Protean Cell II <sup>®</sup>	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA)
Homogenisator: UltraTurrax <sup>®</sup>	IKA Werke Co KG, Staufenberg

Tabelle E11: Ergebnisse der Vorbericht-Auswertung: Borreliose-Impfungen und Antibiosen

Praxis	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Gesamt (alle Hunde)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Zahl (n) / %																				
untersucht	51	100,0	77	100,0	87	100,0	27	100,0	87	100,0	27	100,0	43	100,0	30	100,0	81	100,0	510	100,0
männlich	23	45,1	38	49,3	40	46,0	13	48,2	50	57,5	16	59,3	22	51,2	18	60,0	45	55,6	265	52,0
weiblich	28	54,9	39	50,7	47	54,0	14	51,8	37	42,5	11	40,7	21	48,8	12	40,0	36	44,4	245	48,0
Erfolgte eine Borreliose-Impfung?																				
ja	24	47,1	8	10,4	29	33,3	6	22,2	17	19,5	1	3,7	5	11,6	11	36,7	15	18,5	116	22,8
nein	24	47,1	69	89,6	56	64,4	21	77,8	67	77,0	26	96,3	38	88,4	17	56,7	60	74,1	378	74,1
unbekannt	3	5,8	0	0,0	2	2,3	0	0,0	3	3,5	0	0,0	0	0,0	2	6,6	6	7,4	16	3,1
Erfolgte innerhalb der letzten zwei Jahre vor der serologischen Untersuchung eine Antibiose?																				
ja	25	49,0	22	24,7	49	56,3	13	48,2	18	20,7	17	63,0	25	58,1	18	60,0	40	49,4	227	44,5
nein	17	33,3	52	67,5	32	36,8	11	40,7	55	63,2	6	22,2	17	39,5	10	33,3	31	38,3	231	45,3
unbekannt	9	17,7	3	7,8	6	6,9	3	11,1	14	16,1	4	14,8	1	2,4	2	6,7	10	12,3	52	10,2

Tabelle E12: Ergebnisse der Vorbericht-Auswertung: Antibiotische Wirkstoffe und Grund der Antibiose

Praxis	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Gesamt (alle Hunde)	
Zahl (n) / %	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Wenn ja, mit welchem Wirkstoff? (prozentuale Anteile der antibiotisch behandelten Hunde)																				
Amoxicillin	1	4,0	11	50,0	36	73,5	1	7,7	2	11,1	8	47,1	14	56,0	0	0,0	7	17,5	80	35,2
Andere Penicilline	3	12,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,5	0	0,0	0	0,0	14	77,7	0	0,0	18	7,9
Doxycyclin	8	32,0	1	4,6	2	4,1	1	7,7	2	11,1	0	0,0	0	0,0	2	11,1	1	2,5	17	7,6
Cephalosporine	3	12,0	5	22,7	3	6,1	1	7,7	3	16,7	2	11,8	0	0,0	1	5,6	5	12,5	23	10,1
andere	10	40,0	5	22,7	8	16,3	10	76,9	10	55,6	7	41,1	11	44,0	1	5,6	27	67,5	89	39,2
Erfolgte die Antibiose wegen einer Borreliose-Infektion? (prozentuale Anteile der antibiotisch behandelten Hunde)																				
Ja	6	24,0	2	9,1	1	2,0	1	7,7	2	11,1	0	0,0	0	0,0	1	5,6	0	0,0	13	5,7
Davon: Amoxicillin	0	0,0	1	50,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	7,7
Davon: Doxycyclin	6	100,0	1	50,0	1	100,0	1	100,0	2	100,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	12	92,3
andere	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0



Tabelle E13: Ergebnisse der Vorbericht-Auswertung: Allgemeine Krankheits-Symptome

Praxis	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Gesamt (alle Hunde)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
untersucht	51	100,0	77	100,0	87	100,0	27	100,0	87	100,0	27	100,0	43	100,0	30	100,0	81	100,0	510	100,0
Symptome	35	68,6	18	23,4	56	64,4	8	29,6	12	13,8	21	77,8	27	62,8	19	63,3	52	64,2	248	48,6
Keine Symptome	16	31,4	59	76,6	31	35,6	19	70,4	75	86,2	6	22,2	16	37,2	11	36,7	29	35,8	262	51,4
Vorkommen von häufig mit Borreliose-Erkrankungen assoziierten Symptomen (Anteile von Hunden mit Symptomen)																				
Lahmheit	14	40,0	1	5,6	2	3,6	0	0,0	1	8,3	2	9,5	0	0,0	5	26,3	5	9,7	30	12,1
Müdigkeit/ Fieber	0	0,0	0	0,0	2	3,6	0	0,0	0	0,0	1	4,8	0	0,0	0	0,0	1	1,9	4	1,6
Sonstiges	21	60,0	17	94,4	52	92,8	8	100,0	11	91,6	18	85,7	27	100,0	14	73,7	46	88,4	214	86,3

Tabelle E14: Ergebnisse der Vorbericht-Auswertung: Bereits diagnostizierte Borreliose und hinweisende Krankheits- Symptome

Praxis	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Gesamt (alle Hunde)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Wurde bereits einmal eine Borreliose-Infektion diagnostiziert?																				
Ja (Labor)	6	11,8	2	2,6	0	0,0	0	0,0	2	2,3	0	0,0	1	2,3	1	3,3	0	0,0	12	2,3
Ja (Verdacht)	0	0,0	0	0,0	1	1,1	1	3,7	1	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,6
Wenn ja, zeigen diese Hunde Krankheitssymptome?																				
Von Borreliose-positiven																				
Lahmheit	3	50,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1	0,0	0	0,0	0,	0,0	0	0,0	0	0,0	5	33,3
Fieber	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Glomerulonephritis	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1	6,7
Keine Symptome	3	50,0	2	100,0	0	0,0	1	100,0	2	100,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	9	60,0

Tabelle E15: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der 1. Blutproben

Praxis	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Gesamt (alle Hunde)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
untersucht	51	10,0	77	15,1	87	17,1	27	5,3	87	17,1	27	5,3	43	8,4	30	5,9	81	15,9	510	100,0
Ergebnisse des Zweistufentests (KELA und Lysat-Antigen-Western-Blot (WB))																				
negativ	28	54,9	61	79,2	58	66,6	21	77,7	68	87,2	25	92,5	35	81,3	14	46,6	63	77,7	373	73,1
Davon: (KELA pos.; WB neg.)	4	7,8	10	13,0	1	1,2	3	11,1	6	6,9	7	25,9	7	16,3	2	6,7	4	4,9	44	8,6
Impfung (V)	22	43,1	12	15,5	29	33,3	6	22,2	18	20,7	0	0,0	7	16,3	14	46,7	12	14,8	120	23,5
Infektion (I)	1	2,0	4	5,2	0	0,0	0	0,0	1	1,1	2	7,4	1	2,3	2	6,6	6	7,4	16	3,1
Davon: I + V	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,2	1	0,2
Ergebnisse des C6-Schnelltest (4Dx SNAP) im Falle einer mit dem Zweistufentest festgestellten Infektion (n = 17)																				
Bb (C6-Peptid)	1		4		0		0		1		2		1		2		6		17	100,0
Ap (Ap+Bb)	1		4		0		0		1		1		1		2		3		13	76,5
Ec oder Di	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	0,0

Tabelle E16: Übereinstimmung von Vorberichten und serologischen Untersuchungsergebnissen: Borreliose-Infektion

Praxis	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Gesamt (alle Hunde)	
Zahl (n) / %	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
untersucht	51	10,0	77	15,1	87	17,1	27	5,3	87	17,1	27	5,3	43	8,4	30	5,9	81	15,9	510	100,0
Infektionen- Übereinstimmung von Vorberichten und Serologie																				
neu entdeckt	1	2,0	4	5,2	0	0,0	0	0,0	1	1,1	2	7,4	0	0,0	2	6,6	6	7,4	16	3,1
Vorbericht: Borreliose	6	11,8	2	2,6	1	1,1	1	3,7	3	3,4	0	0,0	1	2,3	1	3,3	0	0,0	15	2,9
Von vorberichtlich positiven (15)																				
Übereinstimmung von Vorberichten und Serologischer Untersuchung: Borreliose-Infektionen																				
bestätigte Infektion	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,3	0	0,0	0	0,0	1	6,7
nicht bestätigte Infektion	6	11,8	2	2,6	1	1,1	1	3,7	3	3,4	0	0	0	0	1	3,3	0	0,0	14	93,3

Tabelle E17.1: Vorberichtliche Daten der ermittelten C6-positiven Hunde (k.A. = keine Angaben; BSH = Berner Sennenhund)

Probe IKK-	Rasse	Alter	Borreliose- Impfung	Antibiose	Wirkstoff	Zeitraum	Grund	Symptome Zeitpunkt 1. Blutprobe
1-22	BSH	10	nein	nein	-	-	-	nein
2-32-	Hovawart	8	nein	ja	Amoxicillin	Vor 7 Monaten	k.A.	nein
2-42	Gäljo Espanol	2	nein	nein	-	-	-	nein
2-55	BSH	7	nein	nein	-	-	-	nein
2-67	Riesen- schnauzer	9	nein	ja	Amoxicillin	Vor 4 Monaten	Lahmheit	Intermittierende Lahmheit
5-42	Labrador-Retr.	5	nein	nein	-	-	-	nein
6-01	Samojede	6	nein	ja	Clindamycin	Vor 2,5 Jahren	Zahn- extraktion	Lahmheit vorn rechts
6-26	BSH	3	nein	ja	Cephalexin	Vor 4 Monaten	Disco- spondylitis	nein
7-04	Airdale Terrier	5	nein	ja	Enrofloxacin	Vor 2 Jahren	Operation	nein
8-02	Welsh Terrier	6	nein	nein	-	-	-	Hinterhand- lähmung

Tabelle 17.2: Vorberichtliche Daten der ermittelten C6-positiven Hunde

Probe IKK-	Rasse	Alter	Borreliose- Impfung	Antibiotisch vorbehandelt	Wirk- stoff	Zeitraum	Grund	Symptome Zeitpunkt 1. Blutprobe				
8-13	Mischling	k.A.	nein	ja	Procain- Penicillin	aktuell	Gastro- enteritis	nein				
9-06	BSH	9	nein	nein	-	-	-	nein				
9-15	Rottweiler	5	nein	nein	-	-	-	nein				
9-24	Deutscher Schäferhund	8	nein	nein	-	-	-	nein				
9-35	Border Collie	2	nein	nein	-	-	-	nein				
9-65	Rottweiler	5	nein	nein	-	-	-	nein				
9-81	Labrador-Mix	8	nein	nein	-	-	-	nein				
Summe												
				ja	nein				ja	nein		
n				0	17				6	11	3	14
%				0	100,0				35,3	64,7	17,6	82,4

Tabelle E18: Vorberichte und Daten der antibiotischen Therapie

<b>Nr. IKK-</b>	<b>Antibiose beendet?</b>	<b>Wirkstoff</b>	<b>Zeitraum zwischen 1. und 2. Blutprobe</b>	<b>Symptome vor Therapie</b>	<b>Symptome nach Therapie</b>
1-22	ja	Doxycyclin	6 Monate	nein	nein
2-32	ja	Doxycyclin	6 Monate	nein	nein
2-42	ja	Doxycyclin	4 Monate	nein	nein
2-55	ja	Doxycyclin	5 Monate	nein	Glomerulonephritis
2-67	ja	Doxycyclin	5 Monate	Lahmheit	nein
5-42	ja	Doxycyclin	4 Monate	nein	nein
6-01	ja	Doxycyclin	6 Monate	Lahmheit	nein
6-26	ja	Doxycyclin	6 Monate	nein	nein
7-04	ja	Amoxicillin	7 Monate	nein	nein
8-02	nein	Doxycyclin	-	Lähmung	-
8-13	ja	Doxycyclin	8 Monate	nein	nein
9-06	nein	Doxycyclin	-	nein	-
9-15	ja	Doxycyclin	7 Monate	nein	nein
9-24	ja	Doxycyclin	7 Monate	nein	nein
9-35	ja	Doxycyclin	7 Monate	nein	nein
9-65	ja	Doxycyclin	6 Monate	nein	nein
9-81	ja	Doxycyclin	5 Monate	nein	nein

Tabelle E19; Serologisch untersuchte Serumproben aus der Borreliose-Routinediagnostik des Instituts für Immunologie. C6-positive Hunde, die nach einiger Zeit nochmals serologisch untersucht wurden (Vorberichte)

Nr. IKK-50-	Borreliose-Impfung	Antibiotika innerhalb der letzten zwei Jahre vor Diagnose?	Therapie der Borreliose beendet?	Wirkstoff	Zeitraum zwischen 1. und 2. Blutprobe	Symptome vor Therapie	Symptome nach Therapie
01	ja	nein	nein	Doxycyclin	12 Monate	Müdigkeit	nein
02	nein	unbekannt	nein	Doxycyclin	7 Monate	nein	nein
03	nein	nein	ja	Doxycyclin	8 Monate	k.A.	nein
04	nein	nein	ja	Doxycyclin	7 Monate	k.A.	nein
05	nein	nein	ja	Doxycyclin	12 Monate	Lahmheit	nein
06	nein	unbekannt	ja	Doxycyclin	11 Monate	Fieber	nein
07	nein	nein	ja	Doxycyclin	9 Monate	Lahmheit	Lahmheit
08	nein	nein	ja	Doxycyclin	17 Monate	Lahmheit	nein
09	nein	nein	ja	Doxycyclin	18 Monate	Lahmheit	Arthritis
10	nein	nein	nein	Doxycyclin	11 Monate	nein	Lethargie
11	nein	nein	ja	Doxycyclin	10 Monate	k.A.	Kreuzbandriss
12	nein	nein	ja	Doxycyclin	4 Monate	Lahmheit	Lahmheit



Tabelle E20: Ergebnisse des 4Dx-SNAP<sup>®</sup>-Tests von Hundesera vor und nach der antibiotischen Therapie: Antikörper-Reaktionen gegenüber *Bb* (C6-Peptid) und *Ap*

	Proben-Nr. IKK-	Vor der antibiotischen Therapie (1. Blutprobe)		Nach der antibiotischen Therapie (2. Blutprobe)	
		<i>Bb</i>	<i>Ap</i>	<i>Bb</i>	<i>Ap</i>
1	1-22	++	++	++	+/-
2	2-32	++	++	+/-	+/-
3	2-42	+++	+++	++	+
4	2-55	+++	+++	+++	+
5	2-67	+/-	+/-	-	+/-
6	5-42	+++	+	++	+
7	6-01	+	-	-	-
8	6-26	+	++	+/-	++
9	7-04	+	++	+/-	+
10	8-02	+	+/-	k.A.	k.A.
11	8-13	+/-	++	-	-
12	9-06	++	-	k.A.	k.A.
13	9-15	++	+	++	++
14	9-24	+	-	-	-
15	9-35	+++	-	+++	-
16	9-65	++	+/-	-	-
17	9-81	+	-	-	-
18	50-01	++	-	+/-	-
19	50-02	+	-	+/-	-
20	50-03	+	-	-	-
21	50-04	+/-	+/-	+	-
22	50-05	+/-	-	-	-
23	50-06	+	-	-	-
24	50-07	+++	++	+	+
25	50-08	+++	-	+++	-
26	50-09	+++	+	++	-
27	50-10	+++	-	+	-
28	50-11	++	-	-	-
29	50-12	++	+/-	+	-

+++ = hochgradig positiv (sehr starke Blaufärbung = Serumkontrolle)

++ = mittelgradig positiv (starke Blaufärbung, aber weniger als Serumkontrolle)

+ = schwach positiv (schwache Blaufärbung, deutlich weniger als Serumkontrolle)

+/- = sehr schwach positiv (Blaufärbung kaum sichtbar)

- = negativ (keine Blaufärbung)

k.A.: Keine Angaben (keine 2. Blutprobe erhalten)

Tabelle E21.1 bis E21.2: Bewertung der Eignung von Kultivierungsmedien für die verschiedenen Borrelienspezies anhand der Vitalität und Zelldichte

Tabelle E21.1

Medium KS: Kaninchen - serum in %)	Borreliens Stamm/Species an Tag 10 der Kultivierung									
	<i>Bbss</i> N40		<i>Bg</i> PBi		<i>Ba</i> PKo		<i>Ba</i> Slovakia			
	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml
<b>BSK-II</b> 7,0 % KS	+++	$6,1 \times 10^6$	+++	$7,9 \times 10^6$	-	-	+++	$7,9 \times 10^6$		
8,0 % KS	+++	$8,5 \times 10^6$	+++	$1,7 \times 10^7$	+	$2,1 \times 10^5$	+++	$5,7 \times 10^6$		
10,0 % KS	+	n.d.	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
12,0 % KS	+	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
14,0 % KS	-	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<b>MKP</b> 5,3 % KS	+	$5,5 \times 10^5$	++	$3,5 \times 10^6$	+++	$5,1 \times 10^6$	+	$1,2 \times 10^5$		
<b>BSK-H</b> 7,2 % KS	+	n.d.	+	$1,8 \times 10^5$	-	n.d.	-	n.d.		
8,0 % KS	-	n.d.	+	$1,7 \times 10^5$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
10,0 % KS	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
12,0 % KS	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
14,0 % KS	-	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

Tabelle E21.2:

Medium t KS: Kaninchen - serum in %)	Borrelienstamm/Spezies an Tag 10 der Kultivierung									
	<i>Blus</i>		<i>Bsp</i>		<i>Bval Rio6</i>		<i>Bval VS116</i>			
	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml	Vitalität	Zellzahl/ml
<b>BSK-II</b> 7,0 % KS	++	$2,5 \times 10^6$	++	$6,5 \times 10^5$	++	$1,2 \times 10^6$	++	$1,2 \times 10^6$	++	$5,4 \times 10^6$
8,0 % KS	++	$2,0 \times 10^6$	++	$8,2 \times 10^5$	+++	$1,0 \times 10^6$	++	$1,0 \times 10^6$	++	$3,2 \times 10^6$
10,0 % KS	++	$1,2 \times 10^6$	+	n.d.	+	$5,6 \times 10^5$	-	n.d.	-	n.d.
12,0 % KS	+	$1,8 \times 10^6$	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
14,0 % KS	+	$4,5 \times 10^6$	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
<b>MKP</b> 5,3 % KS	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
<b>BSK-H</b> 7,2 % KS	++	$2,4 \times 10^6$	-	n.d.	+	$1,4 \times 10^5$	-	n.d.	-	n.d.
8,0 % KS	++	$1,8 \times 10^6$	+	$1,5 \times 10^5$	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10,0 % KS	++	$5,5 \times 10^5$	+	$2,4 \times 10^5$	-	n.d.	+	n.d.	+	$2,5 \times 10^5$
12,0 % KS	++	$1,8 \times 10^5$	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
14,0 % KS	++	$1,3 \times 10^6$	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.

n.d.: Test nicht durchgeführt

+++ : Sehr gute Vitalität

++ : Zufriedenstellende Vitalität  
Spiralisierungsgang der Zellen)

+ : Mangelhafte Vitalität  
entspiralisiert, Zystenformen)

- : Keine Vitalität  
Wachstum sichtbar)

(Starke Fortbewegung, viele Teilungsformen, hoher Spiralisierungsgang der Zellen)  
(Eingeschränkte Fortbewegung, einzelne Teilungsformen, hoher

(Wenig bis keine Fortbewegung, keine Teilungsformen , Zellen vorwiegend

(Keine Beweglichkeit einzelner Zellen oder tote Zellen, Zystenformen oder kein

Tabelle E 22.1 bis E 22.4: Re-isolierung von *Bb* sl aus murinen Geweben

+ : kulturpositiv, - : kulturnegativ, n.d.: nicht durchgeführter Test, )\* = Kontamination

Tabelle E 22.1

Inokulierte Borrelien	Maus Nr.	Gewebe/Organ				
		Herz	Blase	Gelenk	Ohr	Rücken
<i>B. burgdorferi</i> s.s. N40	B01	+	+	+	+	n.d.
	B02	+	+	+	+	n.d.
	B03	+	+	+	+	n.d.
	B04	+	+	+	+	n.d.
	B05	+	+	+	+	n.d.
	B06	+	+	+	+	n.d.
	B07	+	+	+	+	+
	B08	+	+	+	+	+
	B09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B11	+	+	+	+	+
	B12	+	+	+	+	+
	B13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B15	+	+	+	+	+
	B16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B20	+	+	+	+	+
<i>B. garinii</i> PBi	G01	-	-	-	-	n.d.
	G02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G03	-	-	-	-	n.d.
	G04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	G06	-	-	-	_*	n.d.
	G07	-	-	-	-	-
	G08	-	-	-	-	-
	G09	-	-	-	-	-
	G10	-	-	-	-	-
	G11	-	-	-	-	-
	G12	-	-	-	_*	-
	G13	-	-	-	_*	-
	G14	-	-	-	-	_*
	G15	-	-	-	-	-
	G16	_*	-	-	-	_*
	G17	-	-	-	-	-
	G18	-	-	-	-	-
	G19	-	-	-	-	_*
	G20	-	-	-	-	_*
	G21	-	-	-	_*	-

Tabelle E22.2:

Inokulierte Borrelien	Maus Nr.	Gewebe/Organ				
		Herz	Blase	Gelenk	Ohr	Rücken
<i>B. afzelii</i> PKo	A01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	A02	-	-	-	-	n.d.
	A03	+	+	-	-	n.d.
	A04	-	-	-	+	n.d.
	A05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	A06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	A07	_*	_*	_*	_*	_*
	A08	+	-	-	_*	_*
	A09	+	-	+	_*	_*
	A10	+	-	-	_*	-
	A11	+	-	-	+	-
	A12	+	+	-	_*	-
	A13	+	-	-	+	-
	A14	+	-	-	_*	_*
	A15	+	+	-	+	_*
	A16	-	-	-	_*	-
	A17	-	-	-	+	-
	A18	-	+	_*	_*	-
	A19	-	_*	-	-	-
	A20	-	+	-	_*	_*
	A21	-		_*	-	_*
	A22	-	+	-	-	-
	A23	-		-	.	-
<i>B. afzelii</i> Slovakia	AS01	-	-	-	-	n.d.
	AS02	n.d. (Maus verstorben)				
	AS03	-	-	-	-	n.d.
	AS04	-	-	+	-	n.d.
	AS05	-	-	-	-	n.d.
	AS06	-	-	-	_*	n.d.
	AS07	+	-	_*	_*	+
	AS08	_*	_*	_*	_*	_*
	AS09	+	+	+	_*	_*
	AS10	+*	+	+	_*	_*
	AS11	+	-	_*	-	_*
	AS12	_*	_*	_*	_*	_*
	AS13	_*	_*	_*	_*	_*
	AS14	_*	_*	+	_*	_*
	AS15	_*	+	_*	_*	+
	AS16	_*	+	-	-	n.d.
	AS17	+	+	_*	_*	_*
	AS18	-	+	_*	_*	_*
	AS19	_*	_*	_*	_*	_*
	AS20	-	-	_*	-	_*
	AS21	+	+	-	-	_*

Tabelle E22.3:

Inokulierte Borrelien	Maus Nr.	Gewebe/Organ				
		Herz	Blase	Gelenk	Ohr	Rücken
<b><i>B. valaisiana</i></b> <b>VS116</b>	VS01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VS02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VS03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VS04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VS05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	VS06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b><i>B. valaisiana</i></b> <b>Rio 6</b>	VR01	-	-	-	-	-
	VR02	-	-	.	-	-
	VR03	-	-	-	-	-
	VR04	-	-	-	-	-
	VR05	-	-	-	-	-
	VR06	-	-	-	-	-
	VR07	-	-	-	-	-
	VR08	-	-	-	-	-
<b><i>B. spielmanii</i></b> <b>A14S</b>	S01	-	-	_*	-	n.d.
	S02	-	-	-	-	n.d.
	S03	-	-	-	-	n.d.
	S04	-	-	-	-	n.d.
	S05	-	-	-	-	n.d.
	S06	-	-	-	-	n.d.
	S07	-	-	-	-	-
	S08	-	-	_*	-	-
	S09	-	-	-	_*	-
	S10	-	-	-	-	-
	S11	-	-	-	-	-
	S12	-	-	-	_*	-
	S13	-	-	-	-	-
	S14	-	-	-	-	_*
	S15	-	-	-	-	_*
	S16	-	-	-	_*	-
	S17	-	-	-	_*	-
	S18	-	-	-	-	-
<b><i>B. lusitaniae</i></b>	L01	-	-	-	-	n.d.
	L02	-	-	-	-	n.d.
	L03	-	-	_*	_*	n.d.
	L04	-	-	_*	_*	n.d.
	L05	-	-	-	-	n.d.
	L06	-	-	-	-	n.d.
	L07	-	-	_*	_*	_*
	L08	-	-	-	-	-
	L09	-	-	-	-	-
	L10	-	-	-	-	_*
	L11	-	-	-	-	-
	L12	-	-	-	-	-

Tabelle E22.4:

Inokulierte Borrelien	Maus Nr.	Gewebe/Organ				
		Herz	Blase	Gelenk	Ohr	Rücken
<i>B. lusitaniae</i>	L13	-	-	-	-	-
	L14	-	-	-	-	-
	L15	-	-	-	-	_*
	L16	-	-	-	_*	_*
	L17	-	-	-	_*	-
	L18	-	-	-	-	-
	L19	-	-	-	-	_*
	L20	-	-	-	-	-
	L21	-	-	-	-	_*
	L22	-	-	-	-	-
	L23	-	-	-	_*	_*
	L24	-	-	-	_*	_*



Tabelle E23: Absolute Zahlen der für das jeweilige C6-Peptid ermittelten Befunde vergleichend zum Zweistufentest und daraus berechneten Sensitivität in % für jedes C6-Peptid									
Zweistufentest (N Ergebnisse)				BbC6					
Mausgruppe	Pos.	Neg.	Richtig pos.	Richtig neg.	Falsch pos.	Falsch neg.	Sensitivität (%)		
BbssN40	20	0	20	0	0	0	100,0		
Bg PBi	3	18	3	13	5	0	100,0		
Ba PKo	23	0	23	0	0	0	100,0		
Ba Slovakia	17	3	10	2	1	7	58,8		
Bsp A14S	17	1	9	1	0	8	52,9		
BbC6									
BbssN40	20	0	20	0	0	0	100,0		
Bg PBi	3	18	3	14	4	0	100,0		
Ba PKo	23	0	22	1	0	1	95,7		
Ba Slovakia	17	3	11	2	1	6	64,7		
Bsp A14S	17	1	4	0	1	13	23,5		
BaC6-1									
BbssN40	20	0	8	0	0	12	40,0		
Bg PBi	3	18	0	21	0	3	0,0		
Ba PKo	23	0	23	0	0	0	100,0		
Ba Slovakia	17	3	12	1	2	5	70,6		
Bsp A14S	17	1	2	1	0	15	11,8		
BaC6-2									
BbssN40	20	0	13	0	0	7	65,0		
Bg PBi	3	18	1	19	0	2	33,3		
Ba PKo	23	0	23	0	0	0	100,0		
Ba Slovakia	17	3	8	3	0	9	47,1		
Bsp A14S	17	1	2	1	0	15	11,8		

Tabelle E24: qPCR Ergebnisse für Kontrollen und Detektionsgrenzen

(N/A = es konnte kein Wert ermittelt werden)

Kontrolle	C <sub>t</sub> -Wert	Borrelien
<i>B. burgdorferi</i> s.s. N40		
Positivkontrolle	14,9	$1,3 \times 10^8$
Detektionsgrenze	36,2	$1,0 \times 10^0$
Negativkontrolle	N/A	-
<i>B. garinii</i> PBi		
Positivkontrolle	16,26	$11,4 \times 10^8$
Detektionsgrenze	35,5	$1,0 \times 10^2$
Negativkontrolle	N/A	-
<i>B. afzelii</i> PKo		
Positivkontrolle	20,1	$9,6 \times 10^6$
Detektionsgrenze	36,1	$1,0 \times 10^0$
Negativkontrolle	N/A	-
<i>B. afzelii</i> Slovakia		
Positivkontrolle	16,8	$1,1 \times 10^8$
Detektionsgrenze	36,1	$1,0 \times 10^0$
Negativkontrolle	N/A	-
<i>B. spielmanii</i> A14S		
Positivkontrolle	19,2	$8,9 \times 10^7$
Detektionsgrenze	35,4	$1,0 \times 10^1$
Negativkontrolle	N/A	-

## **II Anhang Abbildungen**

Abbildung A1: Muster eines Fragebogens

**Fragebogen für die Serologische Studie über die Borreliose - Diagnostik beim Hund**  
**Dr. R. Straubinger • Institut für Immunologie • Veterinärmedizinische Fakultät • Universität Leipzig**

**Name des Tierhalters**

..... Postleitzahl : .....

Name

**Angaben zum Tier**

..... Geschlecht : m w

Name Rasse

.....  
Geburtsdatum (Tag / Monat / Jahr )

.....  
Tätowienummer

.....  
Chipnummer

**Vorbericht**

**1. Hund gegen Borreliose geimpft ?**

ja nein

**Wie viele Jahre lang geimpft ?**

.....  
Letzte Impfung Monat/Jahr

**2. Antibiose innerhalb der letzten zwei Jahre ?**

ja nein

**Wenn ja :**

.....  
Bitte Zeiträume, Präparate / Wirkstoffe und Behandlungsgrund angeben!

**3. Hund bei der Blutentnahme gesund ?**

ja nein

.....  
Erkrankungen /Symptome

**Dr. R. Straubinger**

**Institut für Immunologie**

**Veterinärmedizinische Fakultät**

**An den Tierkliniken 11**

**04103 Leipzig**

**Inke Krupka**

**Tel: 0341 – 97 38 465**

**krupka@vmf.uni-leipzig.de**

**Mit der Speicherung der Daten zur Verwaltung und Auswertung  
der Befunde bin ich einverstanden.**

.....

# **IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber Borrelien-Lysatantigen**

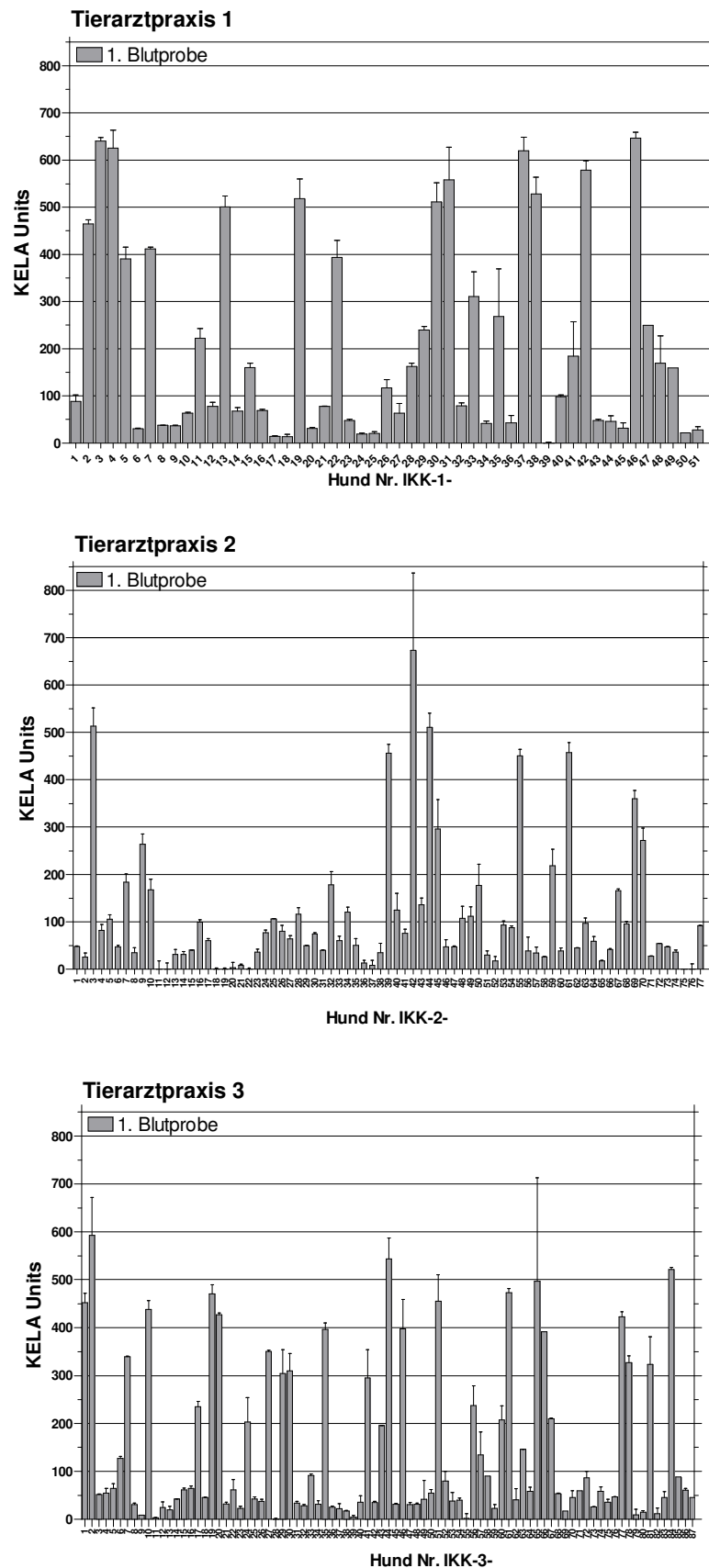
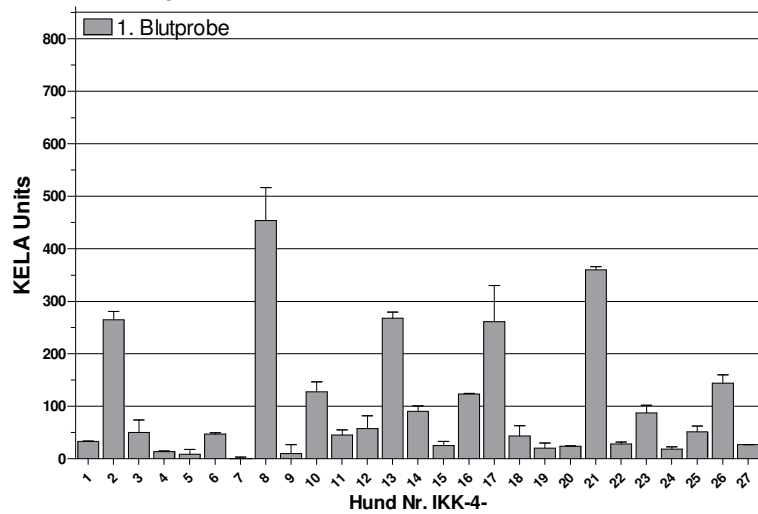


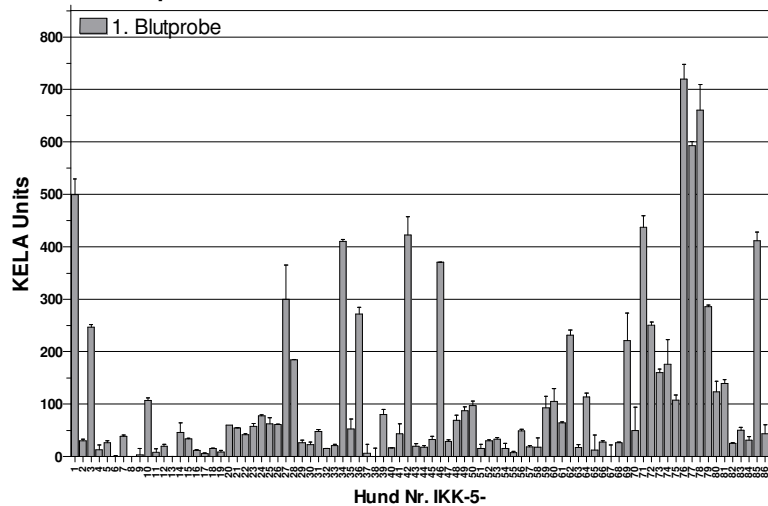
Abbildung A2: KELA-Ergebnisse der 1. Blutproben

# **IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber Borrelien-Lysatantigen**

**Tierarztpraxis 4**



**Tierarztpraxis 5**



**Tierarztpraxis 6**

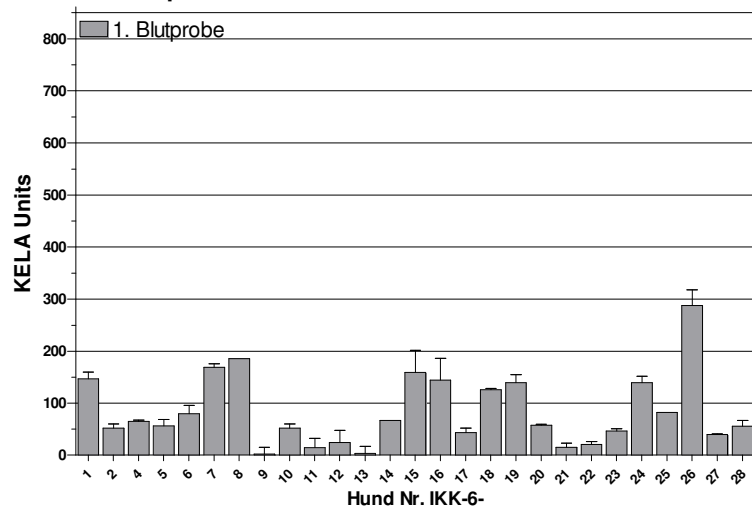
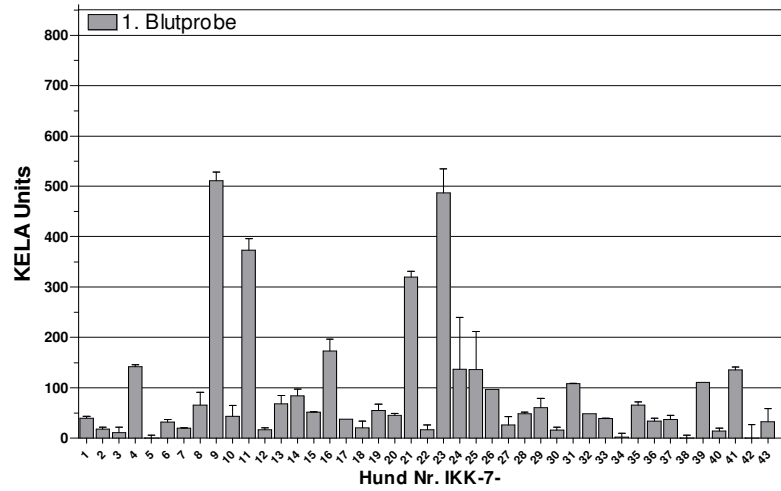


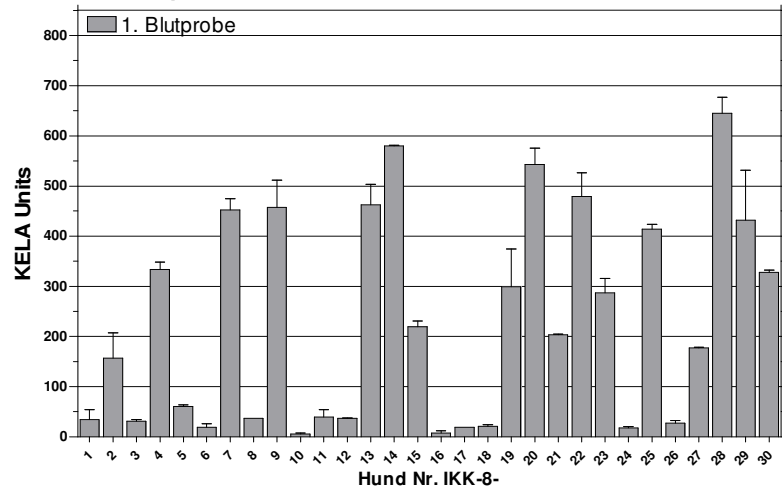
Abbildung A3: KELA-Ergebnisse der 1. Blutproben

## IgG Antikörper-Reaktionen gegenüber Borrelien-Lysatantigen

### Tierarztpraxis 7



### Tierarztpraxis 8



### Tierarztpraxis 9

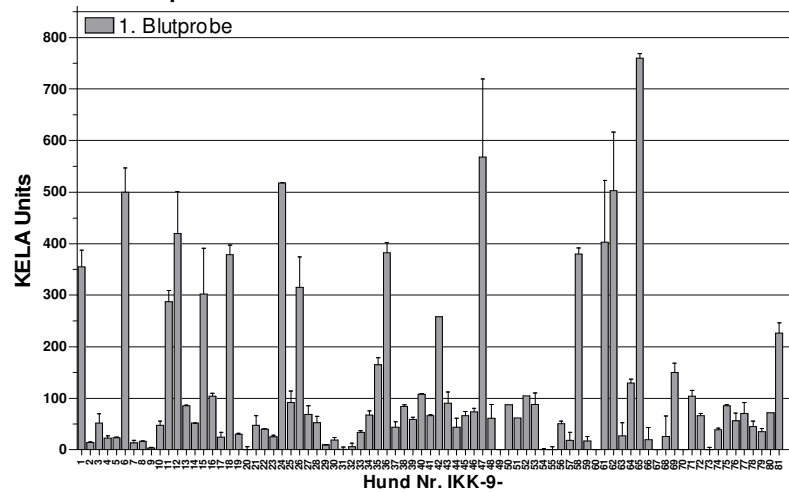


Abbildung A4: KELA-Ergebnisse der 1. Blutproben

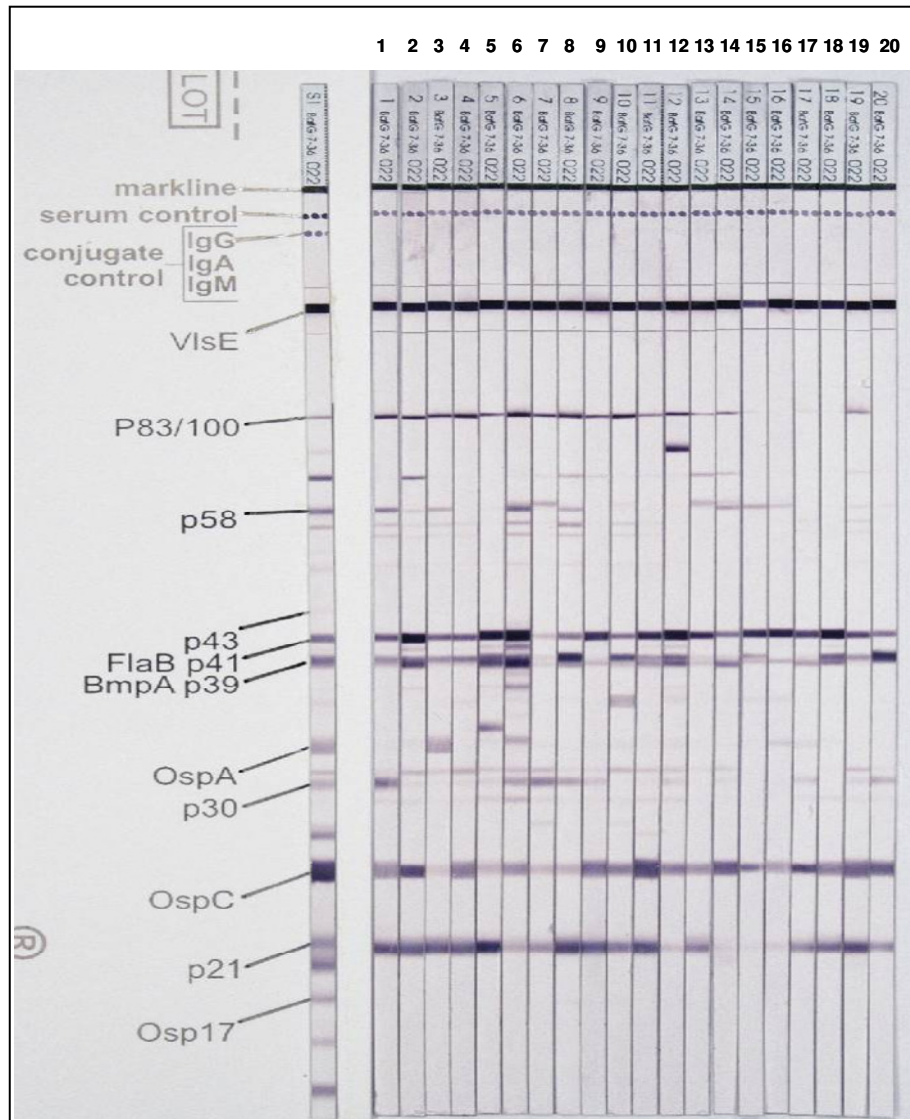


Abbildung A5: Western-Blot Ergebnisse (*B. afzelii* Recom Blot + VlsE, Genzyme Virotech) der mit *B. burgdorferi*-s.s.-N40-inokulierten Mäuse an Tag 56 p.i.

1:	B01	9:	B09	17:	B17
2:	B02	10:	B10	18:	B18
3:	B03	11:	B11	19:	B19
4:	B04	12:	B12	20:	B20
5:	B05	13:	B13		
6:	B06	14:	B14		
7:	B07	15:	B15		
8:	B08	16:	B16		



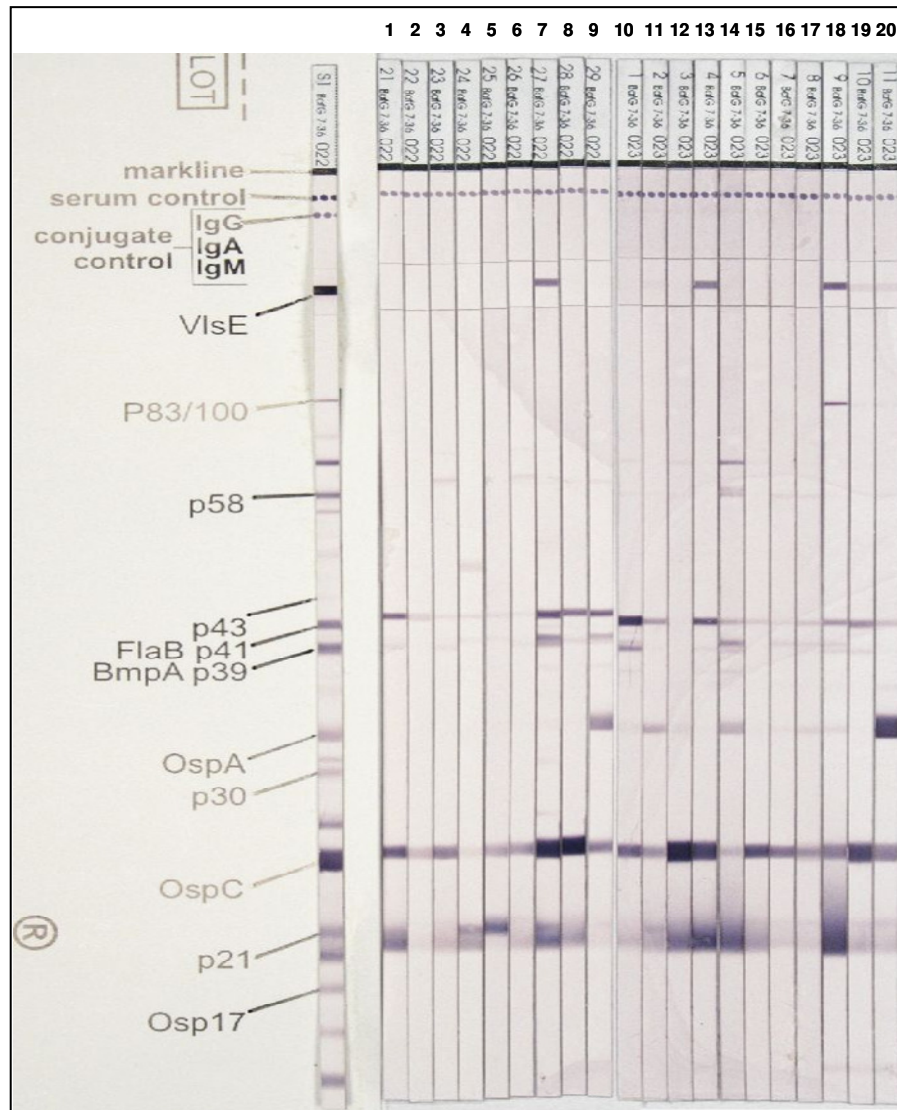


Abbildung A6: Western-Blot Ergebnisse (*B. afzelii* Recom Blot + VlsE, Genzyme Virotech) der mit *B.-garinii*-PBi-inokulierten Mäuse an Tag 56 p.i.

1:	G01	9:	G09	17:	G17
2:	G02	10:	G10	18:	G18
3:	G03	11:	G11	19:	G19
4:	G04	12:	G12	20:	G20
5:	G05	13:	G13		
6:	G06	14:	G14		
7:	G07	15:	G15		
8:	G08	16:	G16		

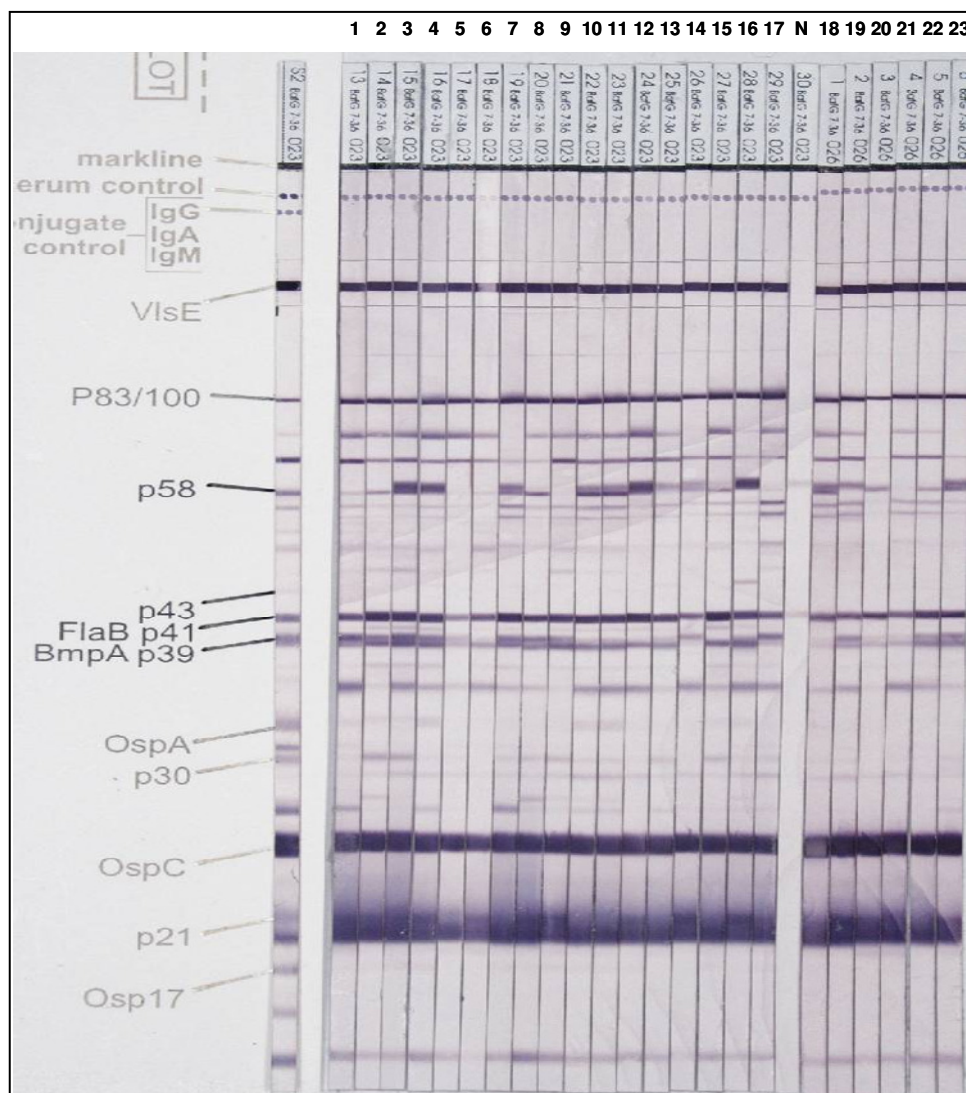


Abbildung A7: Western Blot Ergebnisse (*B. afzelii* Recom Blot + VlsE, Genzyme Virotech) der mit *B.-afzelii*-PKo-inokulierten Mäuse an Tag 56 p.i.

1:	A01	9:	A09	17:	A17
2:	A02	10:	A10	18:	A18
3:	A03	11:	A11	19:	A19
4:	A04	12:	A12	20:	A20
5:	A05	13:	A13	21:	A21
6:	A06	14:	A14	22:	A22
7:	A07	15:	A15	23:	A23
8:	A08	16:	A16	N:	Negatives Kontrollserum

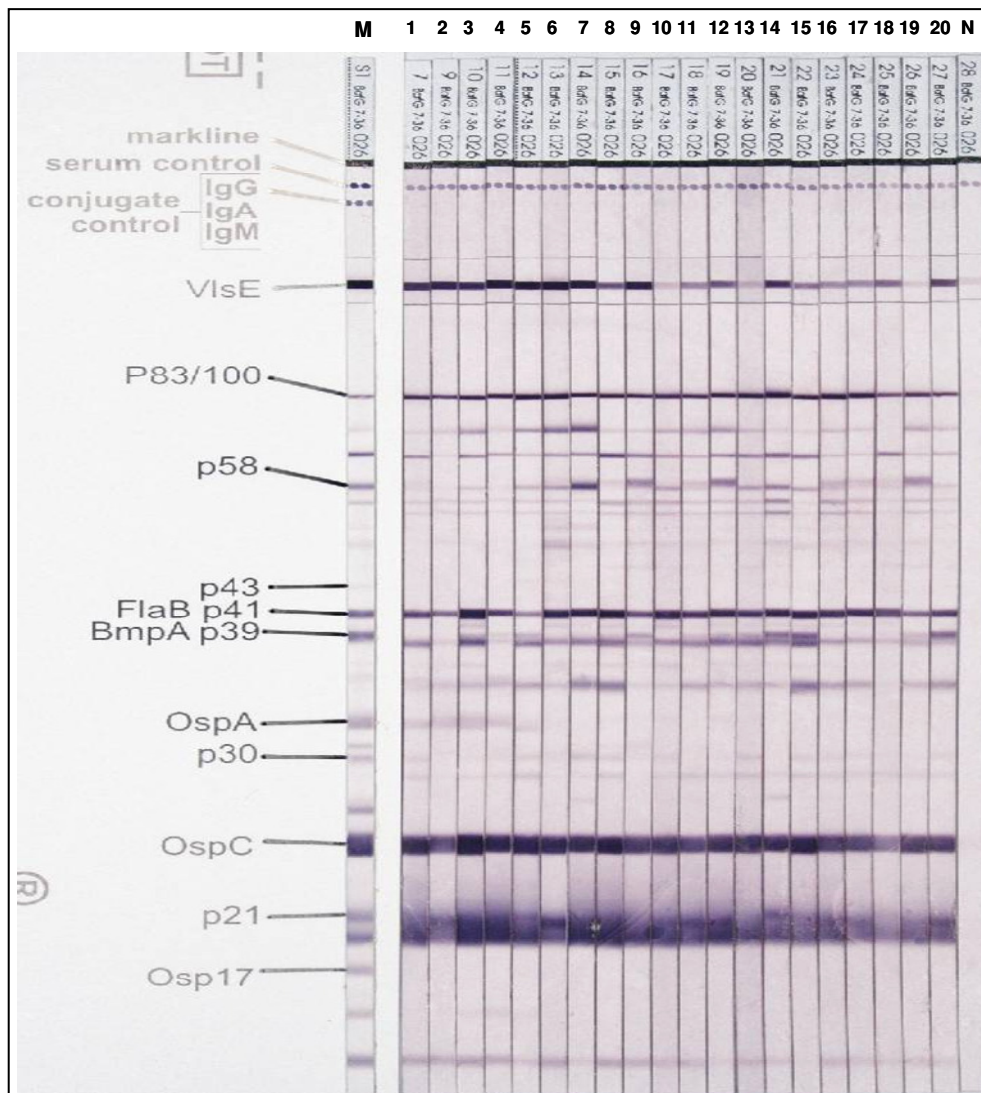


Abbildung A8: Western-Blot Ergebnisse (*B. afzelii* Recom Blot + VlsE, Genzyme Virotech) der mit *B.-afzelii*-Slovakia-inokulierten Mäuse an Tag 56 p.i.

1:	AS01	9:	AS10	17:	AS18
2:	AS03	10:	AS11	18:	AS19
3:	AS04	11:	AS12	19:	AS20
4:	AS05	12:	AS13	20:	AS21
5:	AS06	13:	AS14	N:	Negatives Kontrollserum
6:	AS07	14:	AS15		
7:	AS08	15:	AS16		
8:	AS09	16:	AS17		

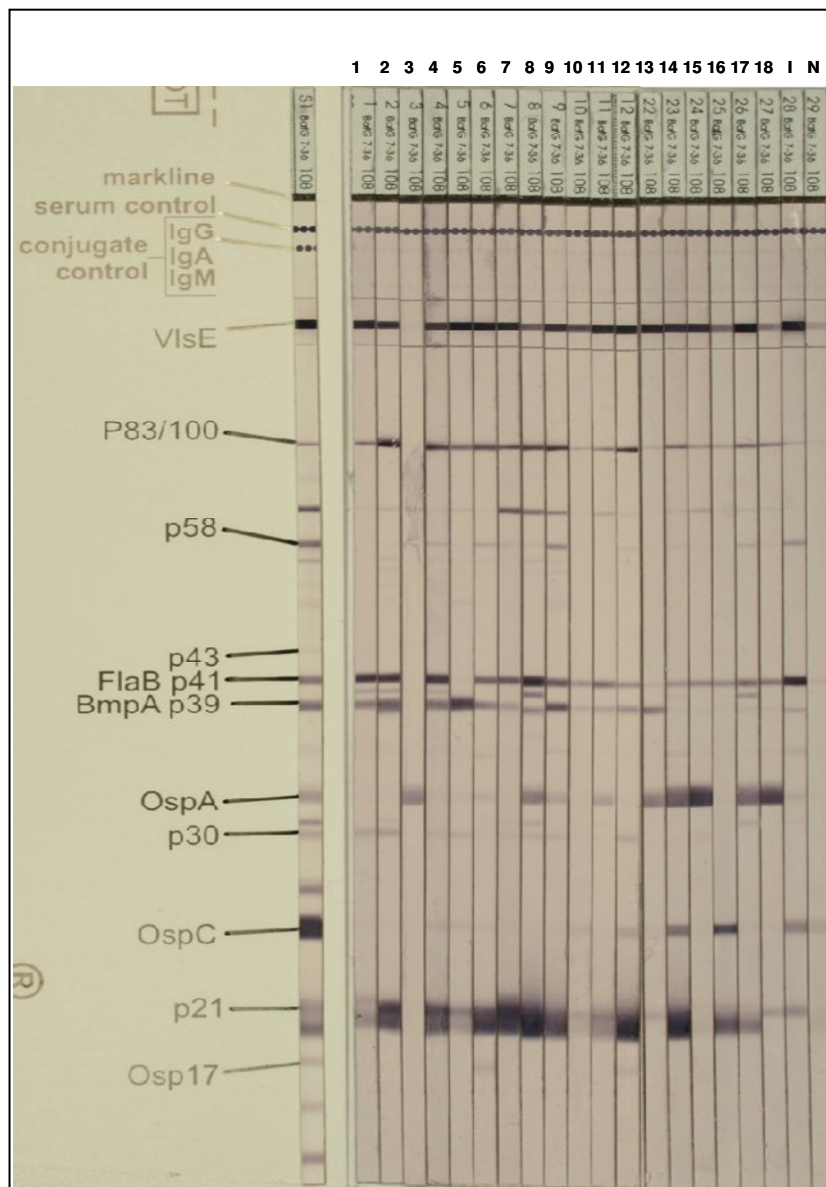


Abbildung A9: Western-Blot Ergebnisse (*B. afzelii* Recom Blot + VlsE, Genzyme Virotech) der mit *B.-spielmanii*-inokulierten Mäuse an Tag 56 p.i.

1:	S01	9 :	S09	17 :	S17
2:	S02	10 :	S10	18 :	S18
3:	S03	11 :	S11	I :	Positives Kontrollserum
4:	S04	12 :	S12	N :	Negatives Kontrollserum
5:	S05	13 :	S13		
6:	S06	14 :	S14		
7:	S07	15 :	S15		
8:	S08	16 :	S16		

## ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die auf verschiedenste Art und Weise einen wesentlichen Anteil am Abschluss dieser Arbeit haben.

Mein großer persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Straubinger als Betreuer dieser Arbeit und als Chef. Nicht nur für die wahrlich nicht alltägliche Selbstverständlichkeit, mit der er stets für alle notwendigen Mittel und optimalen Arbeitsbedingungen sorgte. Besonders für die Geduld und Bereitschaft, jederzeit wissenschaftliche Fragen zu diskutieren, die Förderung von persönlichen Stärken, Hilfe, Rat und moralische Unterstützung - privat wie beruflich. Seine fachliche Kompetenz und Energie, Begeisterung für die Wissenschaft und Freude am Vermitteln von Wissen waren und sind mir ein Vorbild.

Herrn Prof. Dr. Gottfried Alber danke ich sehr, auch für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und zahlreichen wissenschaftlichen Seminare. Ebenso danke ich allen ehemaligen Kollegen des Instituts für Immunologie für die schöne Zeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Jens für die (erfolgreich investierte) Engelsgeduld sowie Christina, Silke und Martin (Rechtschreib-Titan) für viel Hilfe, Aufmunterung und Spaß über unsere gemeinsame Laborzeit hinaus. Des Weiteren danke ich Dr. Uwe Müller und den Mitarbeitern der Versuchstierhaltung des Max-Planck-Instituts für Evolutionäre Anthropologie Leipzig für die Betreuung der Versuchstiere.

Herrn Leif Lorentzen und Tom O'Connor von IDEXX Laboratories Inc., USA danke ich für die Bereitstellung der C6-Peptid-Testsysteme und ihre fachliche Unterstützung, ebenso Herrn Nikola Pantchev von Vet Med Labor, IDEXX, Ludwigsburg. Mein großer Dank gilt allen Tierärzten und Mitarbeitern der Praxen, die sich mitsamt den Hundebesitzern für die Teilnahme an dieser Studie bereit erklärten, fleißig Blutproben schickten und trotz meiner häufigen Nachfragen nie ungeduldig wurden.

Ich danke herzlich meinen lieben Freunden, die mich schon so lange von nah und fern begleiten - für ihre optimistische Unterstützung, die vielen aufbauenden Worte und Taten sowie große Geduld mit mir - besonders Kay, Katharina (KHT), Johanna, Sarah, Holger, Bernhard und Isabella.

Mein großer Dank gilt meiner Familie - besonders meinen Großeltern Walter und Käthe Bense, meinem Vater und der großartigen Renate.

Viktor, Dir danke ich für einfach alles.